

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez
Martín”



Desarrollo de métodos analíticos metabolómicos y metalómicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer : diseño de nuevos biomarcadores químicos de diagnóstico

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:

Raúl González Domínguez

Fecha de lectura: 20 de abril de 2015

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Huelva, 2015



Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencias de los Materiales



**Desarrollo de métodos analíticos metabolómicos y metalómicos
para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Diseño de nuevos
biomarcadores químicos de diagnóstico.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Raúl González Domínguez

Fdo. Raúl González Domínguez

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Fdo. Dr. José Luis Gómez Ariza

Fdo. Dra. Tamara García Barrera

Programa de doctorado: Ciencia y Tecnología Química

Huelva, 2015

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido, directa o indirectamente, en la realización de esta Tesis doctoral: familia, amigos, compañeros de laboratorio (en Huelva, Castellón, Madrid y Lisboa), personal del Hospital Juan Ramón Jiménez y otros colaboradores. En particular, debo agradecer de manera especial al Dr. José Luis Gómez Ariza, director del grupo de *Análisis Medioambiental y Bioanálisis* de la Universidad de Huelva (FQM-141), por los medios y el apoyo proporcionados para la elaboración de este trabajo, así como al *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte* por la concesión de una beca pre-doctoral de Formación del Profesorado Universitario (AP2010-4278).

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	7
1. La enfermedad de Alzheimer	9
1.1. Introducción a la enfermedad de Alzheimer: definición, epidemiología y otros aspectos clínicos	9
1.2. Etiología de la enfermedad de Alzheimer	12
1.2.1. Factores genéticos	13
1.2.2. La hipótesis de la cascada amiloidea	14
1.2.3. La hipótesis tau	17
1.2.4. La hipótesis colinérgica	18
1.2.5. Inflamación	18
1.2.6. Estrés oxidativo	19
1.2.7. Homeostasis de los metales	20
1.3. Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer	21
1.3.1. Criterios clínicos de diagnóstico	21
1.3.2. La necesidad de biomarcadores	25
1.4. Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer	28
1.4.1. Tipos de modelos	28
1.4.2. El ratón transgénico APP _{swe} /PS1 _{ΔE9}	30
1.4.3. Modulación de la inflamación en los modelos de Alzheimer: el ratón transgénico APP/PS1/IL4-KO	30
2. La metabolómica: caracterización global de los sistemas biológicos	32
2.1. Introducción a la metabolómica	32
2.2. Espectrometría de masas vs. resonancia magnética nuclear	35
2.3. Diseño de un experimento metabolómico basado en espectrometría de masas	36
2.3.1. Recogida y tratamiento de muestras	37
2.3.2. Técnicas de análisis basadas en espectrometría de masas	39

2.3.3.	Pre-procesamiento de datos metabolómicos	48
2.3.4.	Análisis estadístico de datos metabolómicos	49
2.3.5.	Identificación de metabolitos	51
2.3.6.	Robustez del procedimiento metabolómico	52
2.4.	Aplicación de técnicas metabolómicas en el estudio de la enfermedad de Alzheimer	54
2.4.1.	Estudios metabolómicos en pacientes de Alzheimer ..	55
2.4.2.	Estudios metabolómicos en ratones modelo	59
2.4.3.	La lipidómica en el estudio de la enfermedad de Alzheimer	60
3.	La metalómica: importancia de los metales en los sistemas biológicos	65
3.1.	Introducción a la metalómica	65
3.2.	Técnicas de análisis en metalómica	68
3.2.1.	Técnicas de separación en metalómica	69
3.2.2.	Detección específica de heteroelementos: el ICP-MS	71
3.2.3.	Identificación estructural de metalo-biomoléculas: la espectrometría de masas molecular	72
3.3.	Aplicación de técnicas metalómicas en el estudio de la enfermedad de Alzheimer	72
OBJETIVOS		77
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES		81
1. Población de estudio		83
1.1.	Pacientes de Alzheimer y deterioro cognitivo leve	83
1.2.	Animales modelo: APP/PS1 y APP/PS1/IL4-KO	85
2. Procedimientos experimentales empleados en estudios con pacientes		87
2.1.	Plataformas metabolómicas basadas en el acoplamiento de técnicas de separación y espectrometría de masas: UHPLC-MS, CE-MS, GC-MS	87
2.1.1.	Análisis de suero mediante UHPLC-MS	87
2.1.2.	Análisis de suero mediante CE-MS	87
2.1.3.	Análisis de suero mediante GC-MS	89
2.1.4.	Pre-procesado de datos	90

2.2. Plataformas metabolómicas basadas en análisis directo mediante espectrometría de masas: DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS	91
2.2.1. Extracción metabolómica de suero	91
2.2.2. Extracción lipidómica de suero	92
2.2.3. Extracción metabolómica de orina	92
2.2.4. Análisis mediante DI-ESI-MS	93
2.2.5. Análisis mediante FIA-APPI-MS	93
2.2.6. Pre-procesado de datos	94
2.3. Análisis de fosfolípidos en suero mediante RP-UHPLC-ESI/ICP-MS	95
2.4. Análisis metalómico de suero en ICP-MS	96
2.4.1. Tratamiento de muestra	96
2.4.2. Análisis multi-elemental mediante ICP-MS	97
3. Procedimientos experimentales empleados en estudios con ratones	98
3.1. Tratamiento de muestra	98
3.1.1. Extracción metabolómica de suero	98
3.1.2. Extracción metabolómica de tejidos	98
3.2. Técnicas de análisis metabolómico	99
3.2.1. Análisis metabolómico mediante UHPLC-MS	99
3.2.2. Análisis metabolómico mediante GC-MS	100
3.2.3. Análisis metabolómico mediante DI/FIA-MS	100
3.2.4. Pre-procesado de datos	101
4. Análisis de los resultados	102
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
Capítulo 1. Desarrollo de técnicas metabolómicas de <i>screening</i> basadas en análisis directo mediante espectrometría de masas y su aplicación en un estudio preliminar de la enfermedad de Alzheimer	107
Capítulo 2. Estudio de la enfermedad de Alzheimer y su progresión desde el deterioro cognitivo leve mediante plataformas metabolómicas basadas en el acoplamiento de técnicas de separación y espectrometría de masas	183

Capítulo 3. Caracterización de los perfiles metalómicos asociados a la enfermedad de Alzheimer y su progresión desde el deterioro cognitivo leve	241
Capítulo 4. Análisis metabolómico de suero, cerebro y órganos periféricos del ratón transgénico APP/PS1 para caracterizar de forma integral las perturbaciones metabólicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer	267
Capítulo 5. Estudio metabolómico de la componente inflamatoria asociada a la enfermedad de Alzheimer en el modelo transgénico APP/PS1/IL4-KO	373
CONCLUSIONES GENERALES	389
GENERAL CONCLUSIONS	393
BIBLIOGRAFÍA	395

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placas seniles y ovillos neurofibrilares en corteza cerebral afectada por la enfermedad de Alzheimer [9]	13
Figura 2. Metabolismo de la proteína precursora amiloidea (APP) a través de la ruta no amiloidogénica (imagen superior) y la ruta amiloidogénica (imagen inferior) [9]	15
Figura 3. Secuencia patogénica de la enfermedad de Alzheimer según la hipótesis de la cascada amiloidea	16
Figura 4. Secuencia patogénica de la enfermedad de Alzheimer según la hipótesis tau	17
Figura 5. Criterios NINCDS-ADRDA para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (www.iqb.es)	22
Figura 6. La cascada de las ómicas	32
Figura 7. Esquema de trabajo simplificado de un experimento metabolómico	36
Figura 8. Esquema del procedimiento de derivatización mediante oximación y sililación	38
Figura 9. Cromatogramas tridimensionales (tiempo de retención vs. m/z vs. intensidad) obtenidos mediante análisis por HPLC-MS (izquierda) y UHPLC-MS (derecha) de una misma muestra de orina [110]	42
Figura 10. Comparación de cromatografía líquida capilar (A), HPLC (B) y CE (C) para el análisis del metaboloma polar de muestras de orina [112]	43
Figura 11. Complementariedad de las técnicas de ionización más empleadas en metabolómica	45
Figura 12. Esquema del procedimiento para el pre-procesado de datos metabolómicos	49
Figura 13. Validación de un método metabolómico mediante el empleo de muestras de control de calidad (cuadrados negros). (A) agrupación de QCs en PCA; (B) predicción de QCs en PLS-DA	53

Figura 14. Modelo simplificado de un sistema biológico, donde se muestran las interacciones entre el genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma y metaloma [199]	66
Figura 15. Diferentes clases de metaloespecies englobadas en el metaloma [202]	67
Figura 16. Técnicas analíticas empleadas en metalómica [202]	68
Figura 17. Complementariedad de las técnicas de separación empleadas en (metalo)-proteómica [204]	70
Figura 18. Alteraciones metabólicas relacionadas con el metabolismo bioenergético	189
Figura 19. Diagramas de barras con intervalos de confianza (95%) para los metabolitos discriminantes identificados mediante DI-ESI-MS en suero de ratones APP/PS1 (TG) y APP/PS1/IL4-KO (IL)	376

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de biomarcadores propuestos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer	27
Tabla 2. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabólicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos	57
Tabla 3. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabólicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en ratones modelo	61
Tabla 4. Función biológica de los elementos metálicos y metaloides más abundantes	65
Tabla 5. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metalómicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	75
Tabla 6. Características demográficas de los pacientes reclutados en el estudio	84
Tabla 7. Condiciones experimentales del espectrómetro de masas para los acoplamientos UHPLC-MS y CE-MS	88
Tabla 8. Condiciones experimentales para la extracción de orina mediante SPE	93
Tabla 9. Condiciones experimentales del espectrómetro de masas para las plataformas DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS	94
Tabla 10. Alteraciones metabólicas detectadas en suero de pacientes de EA mediante DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS	112
Tabla 11. Alteraciones metabólicas detectadas en suero y otros tejidos biológicos del ratón transgénico APP/PS1 relacionadas con fallos en el metabolismo bioenergético	274

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	amyloid β	β amiloide
ANOVA	analysis of variance	análisis de la varianza
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	ionización química a presión atmosférica
API	atmospheric pressure ionization	ionización a presión atmosférica
APOE	apolipoprotein E	apolipoproteína E
APP	amyloid precursor protein	proteína precursora amiloidea
APPI	atmospheric pressure photoionization	fotoionización a presión atmosférica
AUC	area under the curve	área bajo la curva
BGE	background electrolyte	electrolito de fondo
BSTFA	N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CE	capillary electrophoresis	electroforesis capilar
CEC	capillary electrochromatography	electrocromatografía capilar
CI	chemical ionization	ionización química
CZE	capillary zone electrophoresis	electroforesis capilar de zona
DCL	-	deterioro cognitivo leve
DFT	-	demencia frontotemporal
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	-
EA	-	enfermedad de Alzheimer
ECA	electrochemical coulometric array detection	detección electroquímica culombimétrica
e.g.	exempli gratia	por ejemplo
EI	electron impact	impacto electrónico
ESI	electrospray ionization	ionización por electrospray
et al.	et alii	y colaboradores

Abreviaturas

FAD	familial Alzheimer's disease	enfermedad de Alzheimer familiar
FDA	Food and Drug Administration	Agencia de Alimentos y Medicamentos
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance	resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
FT-IR	Fourier transform-infrared spectroscopy	espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier
fwhm	full width at half-maximum	anchura total a mitad de altura
GC	gas chromatography	cromatografía de gases
HEPE	hydroxy-eicosa-pentaenoic acid	ácido hidroxí-eicosa-pentaenoico
HETE	hydroxy-eicosa-tetraenoic acid	ácido hidroxí-eicosa-tetraenoico
HILIC	hydrophilic interaction chromatography	cromatografía de interacción hidrofílica
HMDB	human metabolome database	-
HMDS	hexamethyl-disilazane	hexametil-disilazano
HMM	high molecular mass	alto peso molecular
HPLC	high-performance liquid chromatography	cromatografía líquida de alta resolución
ICD	International Classification of Diseases	-
ICP-AES	inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy	espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente
ICP-MS	inductively-coupled plasma mass spectrometry	espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente
i.e.	id est	es decir
IEF	isoelectric focusing	isoelectroenfoque
IEX	ion exchange	intercambio iónico
IL	interleukin	interleuquina
IT	ion trap	trampa de iones

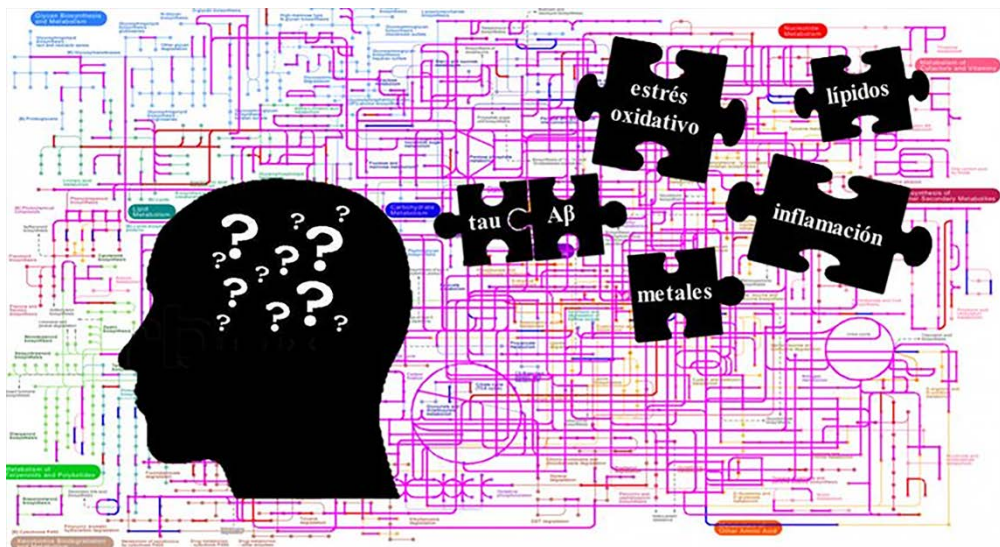
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	-
KO	knockout	inactivo
LC	liquid chromatography	cromatografía líquida
LCR	-	líquido cefalorraquídeo
LLE	liquid-liquid extraction	extracción líquido-líquido
LMM	low molecular mass	bajo peso molecular
LOESS	locally weighted scatter plot smoothing	-
LPL	lyso-phospholipid	liso-fosfolípido
LTB4	leukotrienene B4	leucotrieno B4
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization	ionización/desorción láser asistida por matriz
MDMS-SL	multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics	-
MEKC	micellar electrokinetic capillary chromatography	cromatografía capilar electrocinética micelar
MM	mixed mode	modo mixto
MMSE	Mini-Mental State Examination	-
MRI	magnetic resonance imaging	resonancia magnética de imagen
MRS	magnetic resonance spectroscopy	espectroscopía de resonancia magnética
MS	mass spectrometry	espectrometría de masas
MSI	metabolomics standards initiative	-
MSTFA	N-methyl-trimethylsilyl-trifluoroacetamide	N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NAA	neutron activation analysis	análisis por activación de neutrones
nESI	nanoelectrospray ionization	ionización por nano-electrospray
NFT	neurofibrillary tangles	ovillos neurofibrilares

Abreviaturas

NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association	-
NIST	National Institute of Standards and Technology	-
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-metil-D-aspartato
NP	normal phase	fase normal
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCA	principal component analysis	análisis de componentes principales
PG	prostaglandin	prostaglandina
PHF	paired helical filaments	filamentos helicoidales apareados
PL	phospholipid	fosfolípido
PLS-DA	partial least squares discriminant analysis	análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PPC	-	plasménil-colina
PPE	-	plasménil-etanolamina
PS1	presenilin 1	presenilina 1
PS2	presenilin 2	presenilina 2
PUFA	polyunsaturated fatty acid	ácido graso poliinsaturado
Q	quadrupole	cuadrupolo
QC	quality control	control de calidad
Q-TOF	quadrupole-time of flight	cuadrupolo-tiempo de vuelo
RMN	-	resonancia magnética nuclear
RNS	reactive nitrogen species	especies reactivas de nitrógeno
ROC	receiver operating characteristic	curvas características operativas del receptor
ROS	reactive oxygen species	especies reactivas de oxígeno

RP	reversed phase	fase reversa
SAD	sporadic Alzheimer's disease	enfermedad de Alzheimer esporádica
SEC	size exclusion chromatography	cromatografía de exclusión por tamaño
SFA	saturated fatty acid	ácido graso saturado
SL	sphingolipid	esfingolípido
S/N	signal-to-noise	señal-ruido
SNC	-	sistema nervioso central
SP	senile plaques	placas seniles
SPE	solid phase extraction	extracción en fase sólida
TAC	-	tomografía axial computerizada
TBDMS-Cl	tert-butyl-dimethylsilyl chloride	cloruro de tert-butil-dimetilsililo
TEP	-	tomografía de emisión de positrones
TMCS	trimethyl-silyl-chlorosilane	trimetil-silil-clorosilano
TMSI	trimethyl-silyl-imidazole	trimetil-silil-imidazol
TNF	tumor necrosis factor	factor de necrosis tumoral
TOF	time of flight	tiempo de vuelo
UHPLC	ultra high-performance liquid chromatography	cromatografía líquida de ultra alta resolución
VIP	variable importance in the projection	importancia de la variable en la proyección
vs.	versus	contra
WT	wild type	tipo salvaje
XAS	X-ray absorption spectroscopy	espectroscopía de absorción de rayos X
XRF	X-ray fluorescence	fluorescencia de rayos X

Resumen - Summary



La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común entre la población de edad avanzada, el cual se caracteriza por un inicio insidioso y un declive progresivo de las funciones cognitivas. En la actualidad no existe una cura para esta enfermedad en gran parte debido a que su etiología es aún desconocida, aunque existe la creciente evidencia de que pueden intervenir múltiples procesos patológicos, donde confluyen factores tanto genéticos como ambientales, o propios del envejecimiento. Además, las actuales pruebas de diagnóstico de la EA muestran grandes limitaciones, incluyendo una baja sensibilidad y especificidad, así como la imposibilidad de detectar de forma precoz la sintomatología característica de esta enfermedad. Por todo ello, la identificación de nuevos biomarcadores diagnósticos es de vital importancia.

El objetivo principal de esta Tesis fue la optimización de procedimientos metabolómicos y metalómicos, y su posterior aplicación en el estudio de la etiología de la enfermedad de Alzheimer y el descubrimiento de potenciales biomarcadores de diagnóstico. Los métodos analíticos desarrollados en los trabajos que componen esta Tesis se basan en el empleo de la espectrometría de masas como técnica de detección, debido a su amplio rango de aplicabilidad, sensibilidad y especificidad. Con el fin de conseguir una cobertura metabolómica integral se optimizaron múltiples plataformas analíticas complementarias, incluyendo procedimientos de *screening* basados en análisis directo mediante espectrometría de masas (DI-ESI-MS, FIA-APPI-MS) y su acoplamiento con distintas técnicas de separación ortogonales (UHPLC-MS, GC-MS, CE-MS). Las plataformas de análisis directo mostraron un gran potencial para realizar un *screening* metabólico preliminar de múltiples fluidos y tejidos biológicos, gracias a su reducido tiempo de análisis y simplicidad instrumental. Posteriormente, las técnicas acopladas permitieron llevar a cabo una investigación más exhaustiva de la totalidad del metaboloma mediante el empleo de mecanismos de retención complementarios. Alternativamente, también se desarrolló un procedimiento metalómico basado en el fraccionamiento de metalo-especies según su peso molecular mediante precipitación de proteínas en condiciones no desnaturalizantes y posterior análisis en ICP-MS.

La aplicación de estas técnicas metabolómicas y metalómicas en muestras de suero sanguíneo de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve permitió identificar numerosos mecanismos

patológicos relacionados con la patogénesis de esta enfermedad y su progresión desde etapas pre-clínicas. Así, algunos de los hallazgos más importantes de este estudio fue la detección de alteraciones significativas en la composición de lípidos de membrana, déficits en el metabolismo energético y sistemas de neurotransmisión, hiperamonemia, hiperlipidemia, estrés oxidativo, o una homeostasis alterada de múltiples elementos metálicos y metaloides, entre otros. A su vez, estas perturbaciones metabólicas también fueron observadas en múltiples compartimentos biológicos del modelo APP_{swe}/PS1_{ΔE9}, incluyendo suero, cerebro, hígado, riñón, bazo y timo, evidenciando así la utilidad de este ratón transgénico para modelar la EA. La comparación de distintas regiones cerebrales demostró que las áreas más afectadas por la neuropatología característica de esta enfermedad son el hipocampo y la corteza cerebral, aunque otras regiones también se vieron perturbadas en menor medida, incluyendo el estriado, cerebelo y bulbos olfatorios. Además, las alteraciones detectadas en los órganos periféricos (*i.e.* hígado, riñón, bazo y timo) confirman la naturaleza sistémica de este trastorno neurodegenerativo. Por último, se desarrolló un nuevo modelo de función inmune deteriorada basado en la depleción del gen de la interleucina-4 en APP/PS1 (APP/PS1/IL4-KO) con el objetivo de investigar los mecanismos subyacentes a la componente inflamatoria de la EA. Así, la aplicación de técnicas metabolómicas reveló alteraciones en la biosíntesis de histamina, el metabolismo de aminoácidos, producción de eicosanoides y fallos en el ciclo de la urea.

De este modo, se puede concluir que la aplicación combinada de múltiples técnicas metabolómicas y metalómicas en distintas matrices biológicas, tanto de pacientes humanos como animales modelo, permite estudiar en profundidad la etiología asociada a la enfermedad de Alzheimer, y descubrir así posibles biomarcadores de diagnosis.

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder among older people, which is characterized by an insidious onset and progressive decline of cognitive functions. Nowadays there is no cure for this disease principally because its etiology is still unknown, although there is growing evidence that multiple pathological processes may be involved, with the confluence of genetic, environmental and aging-related factors. Furthermore, current diagnostic tests for AD show great limitations, including low sensitivity and specificity as well as the impossibility of early detection of the characteristic symptoms of this disease. Therefore, the identification of new biomarkers for diagnosis is critical.

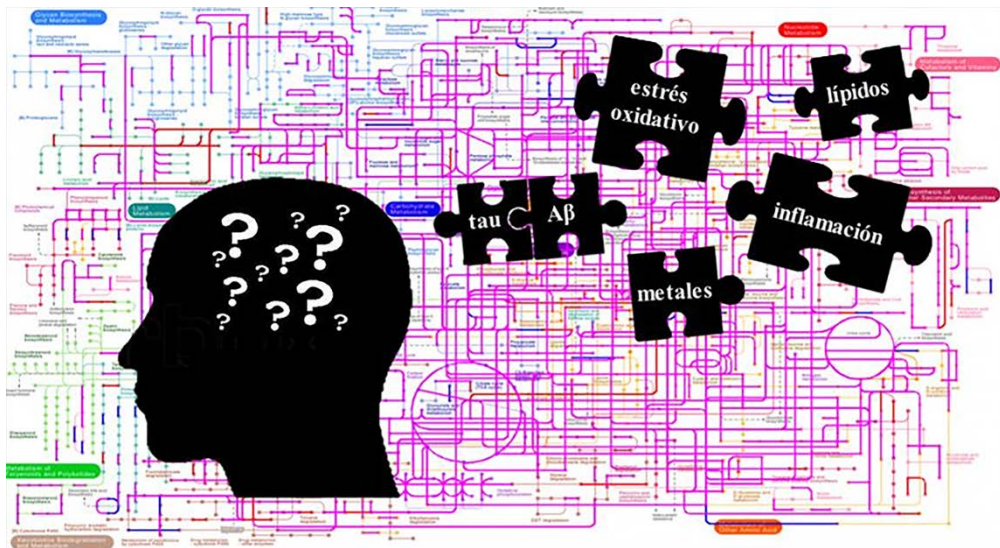
The main objective of this Thesis was the optimization of metabolomic and metallomic approaches, and subsequent application for studying the etiology of Alzheimer's disease and the discovery of potential diagnostic biomarkers. Analytical methods developed in works comprised in this Thesis are based on the use of mass spectrometry as detection technique, due to its wide range of applicability, sensitivity and specificity. In order to get a comprehensive metabolomic coverage we optimized multiple complementary analytical platforms, including screening procedures for direct analysis by mass spectrometry (DI-ESI-MS, FIA-APPI-MS) and its coupling with orthogonal separation techniques (UHPLC-MS, GC-MS, CE-MS). Direct analysis platforms showed a great potential to perform a preliminary metabolic screening in multiple biological fluids and tissues, due to its reduced analysis time and instrumental simplicity. Subsequently, coupled techniques allowed carrying out a more comprehensive investigation of the whole metabolome by using complementary mechanisms of retention. Alternatively, we also developed a metallomic procedure based on the fractionation of metallo-species according to their molecular weight by means of protein precipitation in non-denaturing conditions and subsequent ICP-MS analysis.

The application of these metabolomic and metallomic techniques in serum samples from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment allowed the identification of numerous pathological mechanisms related to the pathogenesis of this disorder and its progression from pre-clinical stages. Thus, some of the most important findings of this study were the detection of significant changes in the composition of membrane lipids, deficits in energy metabolism and neurotransmitter systems, oxidative stress, hyperammonemia, hyperlipidemia, or an altered homeostasis of multiple

metallic and metalloid elements, among others. In turn, these metabolic disturbances were also observed in multiple biological compartments from the APP_{swe}/PS1_{ΔE9} model, including serum, brain, liver, kidney, spleen and thymus, thus demonstrating the utility of this transgenic mouse for modelling AD. The comparison of different brain regions showed that the areas most affected by the characteristic neuropathology of this disease were hippocampus and cortex, although other regions were also disrupted to a lesser extent, including the striatum, cerebellum and olfactory bulbs. Furthermore, alterations detected in peripheral organs (*i.e.* liver, kidney, spleen and thymus) confirm the systemic nature of this neurodegenerative disorder. Finally, a new model of impaired immune function was developed based on the depletion of interleukin-4 gen in APP/PS1 (APP/PS1/IL4-KO) in order to investigate mechanisms underlying to the inflammatory component of AD. Thus, the application of metabolomic techniques revealed alterations in the biosynthesis of histamine, amino acid metabolism, production of eicosanoids and failures in the urea cycle.

Therefore, it can be concluded that the combined application of multiple metabolomic and metallomic approaches in different biological matrices, from both human patients and animal models, allows to study in depth the etiology associated with Alzheimer's disease, and discover potential biomarkers of diagnosis.

Introducción



1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: DEFINICIÓN, EPIDEMIOLOGÍA Y OTROS ASPECTOS CLÍNICOS

En 1907, el neurólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer publicó el caso de Auguste Deter, una paciente de 51 años que mostraba síntomas de una enfermedad psiquiátrica no descrita hasta el momento, con un deterioro severo de la memoria, desorientación, alucinaciones y problemas del habla [1, 2]. El análisis *post-mortem* del tejido cerebral reveló una importante atrofia cortical causada por una “alteración química de las neurofibrillas” y “la deposición de una sustancia metabólica patológica en las neuronas”. Tres años más tarde, el también psiquiatra Emil Kraepelin identifica la sintomatología característica de este “nuevo tipo” de demencia presenil, y la bautiza como enfermedad de Alzheimer (EA) en honor al descubridor de la base neuropatológica de este desorden neurodegenerativo [3].

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un inicio insidioso y un declive progresivo de las funciones cognitivas, incluyendo memoria, razonamiento y orientación, con una pérdida fatal en último término de las funciones mentales. La EA es actualmente la forma de demencia más común entre la población de edad avanzada, representando más de un 70% de los casos de demencia en todo el mundo [4]. Habitualmente se detecta a partir de los 65 años, aunque existen formas de aparición temprana, y la tasa de incidencia aumenta exponencialmente con la edad, observándose el aumento más notable a los 70-80 años. Además, se ha constatado que la prevalencia es más alta en mujeres que en hombres, en particular entre la población mayor de 85 años [5].

Desde un punto de vista clínico, la EA puede clasificarse en dos categorías en función de la componente genética asociada [6], lo cual repercute en la edad de inicio y forma de presentación:

- 1) **EA familiar** (FAD, *familial Alzheimer’s disease*): enfermedad autosómica dominante y hereditaria, con mutaciones en los genes codificantes de la proteína precursora amiloidea (APP, *amyloid precursor protein*), presenilina 1 (PS1, *presenilin 1*) y/o presenilina 2 (PS2, *presenilin 2*). Se

caracteriza por un inicio precoz (antes de los 65 años), curso clínico rápido y muerte temprana. Representa menos del 2% de todos los casos.

- 2) **EA esporádica** (SAD, *sporadic Alzheimer's disease*): no hereditaria, en la que intervienen numerosos factores de riesgo ambientales y genéticos, siendo el más importante la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE, *apolipoprotein E*). De inicio tardío (a partir de los 65 años), supone la forma más común de la EA.

Además de la edad, que es el desencadenante primario de la EA, y la componente genética, otros muchos factores de riesgo han sido asociados a esta enfermedad neurodegenerativa [4]. Algunos pueden relacionarse con una reserva cerebral y cognitiva disminuida, incluyendo tamaño cerebral reducido, bajo nivel educativo y ocupacional, baja capacidad mental, o actividad mental y física reducida durante la vejez. Además, también se ha demostrado que existe un mayor riesgo de desarrollar un cuadro de demencia en individuos afectados por otros daños cerebrales (*e.g.* enfermedad cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico). Los factores de riesgo vasculares también juegan un papel importante en la aparición de la EA, incluyendo enfermedades vasculares, hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, obesidad o arterosclerosis, entre otros. Sin embargo, se desconoce si este riesgo vascular es un desencadenante directo de la neuropatología característica del Alzheimer o es responsable de la aparición de una patología cerebrovascular concomitante a la EA.

El curso clínico de la enfermedad de Alzheimer puede dividirse en cuatro etapas, con un deterioro cognitivo y funcional progresivo que puede llevar entre 5 y 8 años tras el diagnóstico, pero con una etapa subclínica que puede extenderse durante varias décadas [7].

- 1) **Pre-demencia**: los primeros síntomas de deterioro cognitivo pueden aparecer varios años antes del diagnóstico clínico del cuadro de demencia, e incluyen dificultad para adquirir nueva información, pérdida de memoria, dificultades leves en las funciones ejecutivas (atención, planificación, flexibilidad y razonamiento abstracto), trastornos de la memoria semántica, apatía y síntomas depresivos. Esta fase preclínica, también denominada deterioro cognitivo leve (DCL), es considerada como una etapa de transición entre el envejecimiento normal y la EA. Sin embargo, el DCL es un síndrome complejo con varios desenlaces posibles de modo

que, aunque el 80% de los pacientes terminan desarrollando EA, otros tienen una forma benigna de DCL como parte del proceso normal de envejecimiento [8]. Por ello, existe una gran dificultad para diferenciar entre la EA incipiente y un deterioro de la memoria reversible no progresivo (*e.g.* depresión).

- 2) **Demencia leve:** la característica clínica más destacada en esta fase es un deterioro significativo del aprendizaje y la memoria (principalmente la memoria reciente), pero también pueden presentarse dificultades en las funciones ejecutivas, problemas del habla, apraxia, desorientación espacial y agnosia.
- 3) **Demencia moderada:** deterioro progresivo de la memoria a corto y largo plazo, razonamiento lógico, capacidad de planificación y organización, empeoramiento de los problemas del lenguaje (incapacidad de recordar el vocabulario, parafasia). Se hacen frecuentes problemas neuropsiquiátricos y del comportamiento, como el aumento de la irritabilidad, agresividad, cambios de humor o distracción. Los pacientes en esta etapa de demencia moderada se vuelven dependientes debido a la incapacidad de llevar a cabo tareas comunes de la vida diaria.
- 4) **Demencia severa:** el lenguaje se reduce a frases simples, aunque se conserva la receptividad emocional, y las funciones motoras básicas se debilitan. Finalmente, la causa de muerte suele ser un factor externo (infecciones, neumonía).

En la actualidad no existe una cura para la enfermedad de Alzheimer, en gran parte debido a que aún se desconocen las causas exactas que la provocan, pero se han desarrollado algunos tratamientos farmacológicos que ofrecen moderados beneficios sintomáticos [9]. Entre ellos pueden destacarse los fármacos anticolinesterásicos, que inhiben el funcionamiento de la acetilcolinesterasa (*e.g.* donezepilo, rivastigmina, galantamina), la memantina (un antagonista no competitivo de los receptores NMDA que protege a las neuronas de la excitotoxicidad mediada por el glutamato), y otros tratamientos en periodo de investigación enfocados en la inhibición de la producción y agregación de placas seniles en el cerebro (*e.g.* moduladores de secretasas, inmunoterapia frente a péptidos amiloideos), así como otros fármacos usados para tratar comorbilidades habituales de la EA (*e.g.* antiinflamatorios, antioxidantes, estatinas). Asimismo, se han descrito varios factores

protectores que pueden ayudar a prevenir la EA, incluyendo la actividad física y mental, y una dieta equilibrada y rica en vitaminas relacionadas con la homocisteína (vitamina B12, ácido fólico), antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados [4].

1.2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La etiología exacta de la enfermedad de Alzheimer es aún desconocida, aunque existe una creciente evidencia de que pueden intervenir múltiples procesos patológicos, donde confluyen factores tanto genéticos como ambientales, o propios del envejecimiento. En este contexto cabe destacar que, aunque la enfermedad de Alzheimer ha sido considerada clásicamente como un desorden neurodegenerativo primario que afecta específicamente al sistema nervioso central (SNC), existe una creciente evidencia de que los procesos patológicos asociados a la EA también pueden manifestarse en el sistema periférico [10]. Esta visión sistémica y multifactorial de la EA es de gran interés ya que respalda el uso de muestras periféricas en la investigación de la patofisiología de la EA, incluyendo fluidos biológicos como suero o plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo (LCR), células periféricas (*e.g.* linfocitos, fibroblastos de la piel) y tejido no cerebral, lo que permite soslayar las limitaciones asociadas al estudio de muestras de tejido cerebral *post-mortem*.

La neuropatología propia de la EA se ha relacionado tradicionalmente con una proteopatía causada por la agregación anormal de proteínas en el cerebro, principalmente en áreas corticales y el lóbulo temporal medial (*e.g.* hipocampo), lo cual conduce a la pérdida gradual de neuronas y sinapsis [9]. Estas lesiones cerebrales se denominan placas seniles (SP, *senile plaques*) y ovillos neurofibrilares (NFT, *neurofibrillary tangles*), y son consideradas como las dos componentes características de la expresión fenotípica de la EA (Figura 1). Sin embargo, a día de hoy aún se desconocen los mecanismos exactos de producción y deposición de SP y NFT, así como si estos procesos patológicos son causa o consecuencia de la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

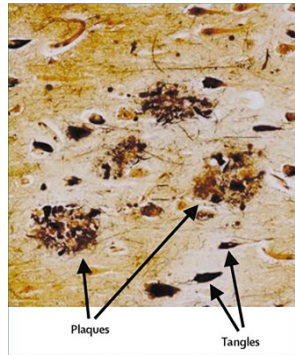


Figura 1. Placas seniles y ovillos neurofibrilares en corteza cerebral afectada por la enfermedad de Alzheimer [9].

Alternativamente se han propuesto otras hipótesis complementarias que tratan de explicar la compleja etiología de la EA, como la hipótesis colinérgica, el estrés oxidativo, la neuroinflamación o la implicación del metabolismo de distintos metales, que en conjunto dan una visión general sobre los múltiples mecanismos patológicos que subyacen a esta enfermedad.

1.2.1. FACTORES GENÉTICOS

En la actualidad sólo se conocen cuatro genes inequívocamente relacionados con la patogénesis de la EA, incluyendo el gen codificante de la proteína precursora amiloidea (APP, *amyloid precursor protein*), presenilina 1 (PS1, *presenilin 1*), presenilina 2 (PS2, *presenilin 2*) y apolipoproteína E (APOE, *apolipoprotein E*). Los tres primeros están implicados únicamente en el desarrollo de la forma familiar de inicio temprano de la EA (FAD), siendo la mutación del gen PS1 la más común [11]. Las mutaciones de estos tres genes están directamente relacionadas con la producción de péptidos β amiloideos ($A\beta$) y la deposición de placas seniles, corroborando así la importancia de la hipótesis amiloidea en la patogénesis de la EA (ver sección 1.2.2). Por el contrario, el gen de la APOE es un factor de riesgo tanto para la EA esporádica como la forma familiar de esta enfermedad [12]. La APOE es una proteína implicada en numerosas funciones dentro del SNC, como el transporte de lípidos (*e.g.* colesterol), mantenimiento y reparación de neuronas y sinapsis, o la eliminación de toxinas. Sin embargo, la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la APOE ha sido relacionado con los procesos de la agregación y

deposición de péptidos A β , contribuyendo así a la patogénesis de la EA y adelantando la edad de inicio.

Además, numerosos estudios genómicos recientes han permitido relacionar el riesgo de padecer EA con mutaciones en otros genes, incluyendo CLU, CR1, PICALM, BIN1, EPHA1, ABCA7, MS4A4A, MS4A6E, CD33 y CD2AP, pero ninguno ha sido verificado con la suficiente certeza debido a la heterogeneidad de este desorden neurodegenerativo [11].

1.2.2. LA HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA

La formación de placas seniles (SP) está ampliamente aceptada por la comunidad científica como una de las características claves de la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Estas placas tienen su origen en la deposición extraneuronal de péptidos β amiloideos (A β), los cuales se generan mediante proteólisis de la proteína precursora amiloidea. La APP es una proteína integral de membrana altamente concentrada en las sinapsis neuronales, que puede ser metabolizada mediante la acción de tres proteasas denominadas α -, β - y γ -secretasas (Figura 2). En condiciones normales (ruta no amiloidogénica), la APP se metaboliza en dos etapas mediante la acción de α -secretasa y γ -secretasa, dando lugar a un péptido de bajo peso (p3) que posteriormente puede ser degradado mediante la acción de diferentes metalopeptidasas y eliminado del cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Por el contrario, en pacientes afectados por la EA, la proteólisis mediante β -secretasa genera péptidos A β de cadena larga (A β 40/A β 42), con una alta capacidad de auto-agregación para formar placas neurotóxicas.

En la FAD, las mutaciones en los genes codificantes de la APP y las presenilinas (proteínas que funcionan como subcomponentes de la γ -secretasa) favorecen la ruta amiloidogénica del metabolismo de la APP, incrementándose así la producción de estos péptidos insolubles [13]. Sin embargo la acumulación de estas placas en la SAD, en la que no intervienen causativamente estos genes, se ha asociado a fallos en los procesos de eliminación de estos péptidos A β mediante células microgliales, la subexpresión de proteasas encargadas de su degradación o a alteraciones en el transporte a través de la barrera hematoencefálica [14]. De este modo, según la hipótesis de la cascada amiloidea, el evento central de la patogénesis de la EA sería la acumulación de SP como consecuencia de un desbalance en la

homeostasis cerebral de los péptidos A β (Figura 3), causado por la sobreproducción de estos péptidos en la FAD y una degradación deficitaria en la SAD [9].

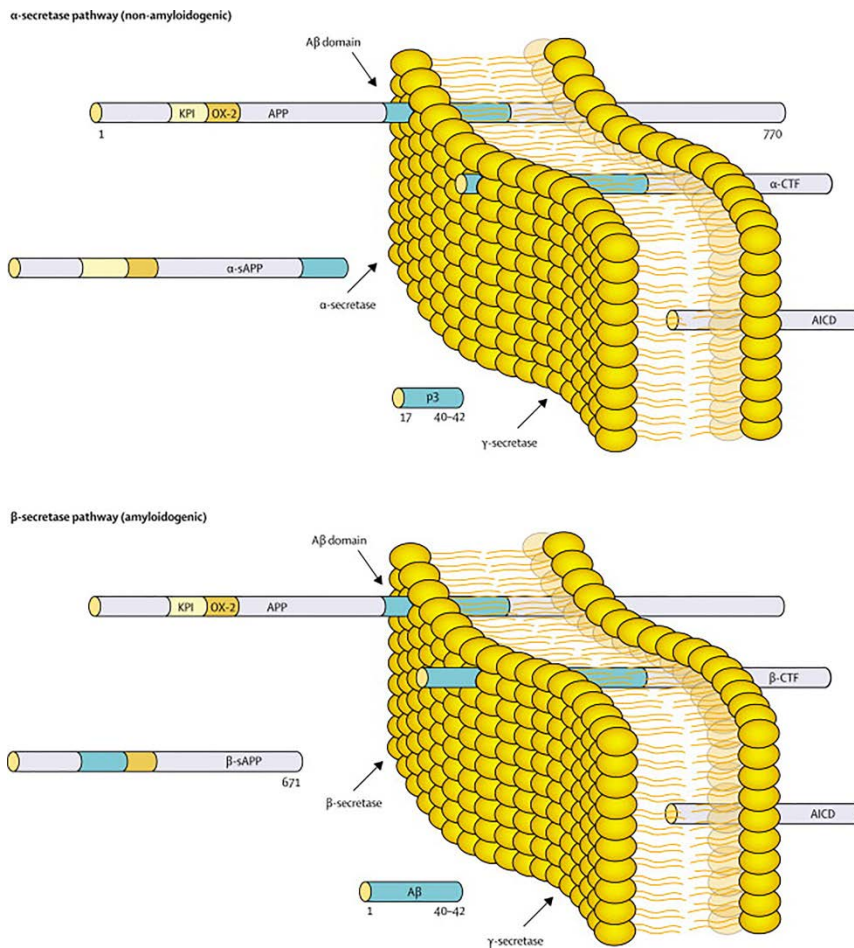


Figura 2. Metabolismo de la proteína precursora amiloidea (APP) a través de la ruta no amiloidogénica (imagen superior) y la ruta amiloidogénica (imagen inferior) [9].

Finalmente, estos péptidos A β sufren cambios conformacionales hacia estructuras *β-sheet*, facilitándose así su agregación en forma de oligómeros solubles y placas seniles. La deposición de estas placas seniles inicia la cascada patológica de la EA debido a su neurotoxicidad, desencadenando mecanismos de respuesta inflamatoria y estrés oxidativo que conducen a la degeneración neuronal y finalmente la aparición de demencia (Figura 3) [13]. Sin embargo, los oligómeros solubles también juegan un papel en la

patogénesis de la EA, inhibiendo la potenciación a largo plazo en el hipocampo e interrumpiendo la plasticidad sináptica [15].

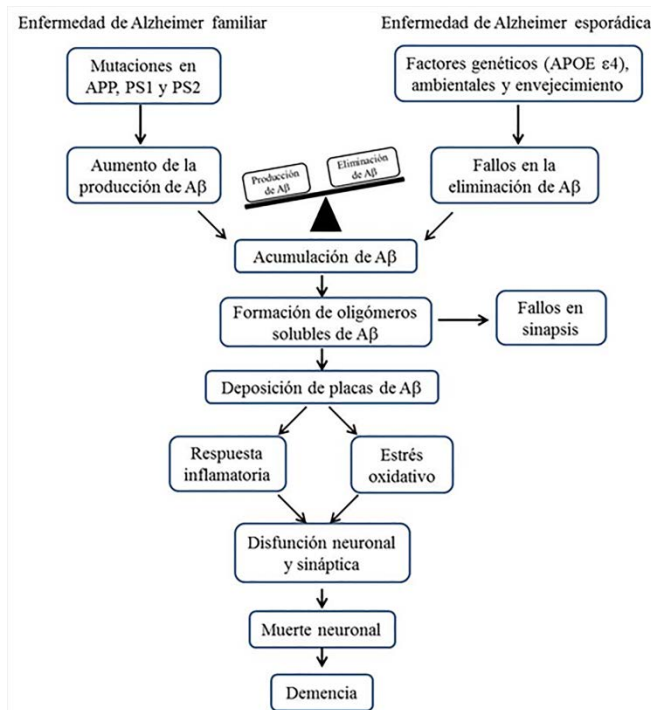


Figura 3. Secuencia patogénica de la enfermedad de Alzheimer según la hipótesis de la cascada amiloidea.

Debido a la omnipresencia de las placas seniles tanto en FAD con en SAD, los niveles fisiológicos de péptidos Aβ se han considerado tradicionalmente como biomarcadores idóneos para la detección de la EA. Además de acumularse en áreas corticales y subcorticales del cerebro, principalmente depositados en placas, pero también en formas solubles y asociados a membrana, los péptidos Aβ pueden encontrarse en el LCR y, tras atravesar la barrera hemoatoencefálica, en la sangre. Así, numerosos estudios han demostrado que los niveles de Aβ42 se encuentran disminuidos en LCR de pacientes afectados por EA, mientras que los niveles plasmáticos de este péptido suelen estar aumentados [16]. Además, estos péptidos también pueden encontrarse en otros tejidos no neuronales (*e.g.* plaquetas, músculo esquelético, hígado), corroborando así el carácter sistémico de esta enfermedad neurodegenerativa [17].

1.2.3. LA HIPÓTESIS TAU

Junto a la formación de placas seniles, el otro rasgo característico de la EA es la presencia de ovillos neurofibrilares (NFT) intraneuronales, compuestos por proteína τ hiperfosforilada. Sin embargo, a diferencia de la hipótesis amiloidea, no se conoce ningún gen implicado en la hiperfosforilación de tau en la EA.

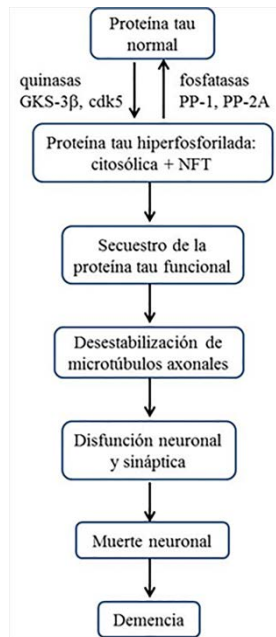


Figura 4. Secuencia patogénica de la enfermedad de Alzheimer según la hipótesis tau.

La proteína tau es una proteína axonal que juega un rol fundamental en la formación y estabilización de los microtúbulos neuronales. Así, se ha demostrado que la estabilidad del citoesqueleto neuronal depende del equilibrio entre los procesos de fosforilación-desfosforilación de la proteína tau, los cuales están regulados por diferentes quinasas y fosfatasas. En la EA, la hiperfosforilación de tau parece tener su origen en la sobreexpresión de varias quinasas (GSK-3 β y cdk5) y la sub-expresión de fosfatasas (PP-1 y PP-2A), lo que conduce a importantes cambios conformacionales de esta proteína [18]. Posteriormente, la proteína tau hiperfosforilada se estructura en forma de filamentos heicoidales apareados (PHF, *paired helical filaments*), los cuales pueden agregarse para formar ovillos neurofibrilares que se depositan

intracelularmente en el hipocampo, la corteza entorrinal y la amígdala. Sin embargo, esta proteína hiperfosforilada también puede permanecer en su forma citosólica soluble sin agregar. En cualquier caso, la pérdida de proteína tau funcional debido a la hiperfosforilación, ya sea en su forma polimerizada o soluble, provoca la desestabilización de los microtúbulos axonales, comprometiendo así gravemente el funcionamiento neuronal y sináptico (Figura 4).

Al igual que los péptidos A β , la medición de los niveles de proteína tau se ha convertido en uno de los biomarcadores clásicos para el estudio de la EA. Así, los niveles de proteína tau, tanto total como hiperfosforilada, suelen verse incrementados tanto en LCR como en sangre de pacientes con EA [16].

1.2.4. LA HIPÓTESIS COLINÉRGICA

La reducción de la neurotransmisión colinérgica es una de las hipótesis más antiguas surgidas para explicar las anomalías neuroquímicas observadas en la enfermedad de Alzheimer. Esta teoría patogénica relaciona la EA con un déficit en los niveles cerebrales del neurotransmisor acetilcolina como consecuencia de la pérdida de neuronas colinérgicas en hipocampo y corteza cerebral, y la sub-expresión de la colina acetiltransferasa, la enzima responsable de su biosíntesis [19]. Numerosos estudios relacionaron esta disfunción colinérgica con el deterioro cognitivo observado en los pacientes de EA debido a la función prominente que juega la acetilcolina en el correcto funcionamiento de la memoria y los procesos de aprendizaje. Además, esta hipótesis ha servido como base para el desarrollo de la mayoría de los fármacos que existen en la actualidad para el tratamiento paliativo de esta enfermedad: los fármacos anticolinesterásicos, empleados para aumentar los niveles cerebrales de acetilcolina mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa.

1.2.5. INFLAMACIÓN

Los procesos neuroinflamatorios se han relacionado estrechamente con el desarrollo de la patofisiología de la EA, aunque aún existe una gran controversia sobre si estos procesos son causantes del daño neuronal observado en esta enfermedad o si por el contrario son tan sólo una respuesta natural de protección frente a otros procesos patológicos (*e.g.* deposición de

A β , formación de NFT). Estos mecanismos inflamatorios parecen estar causados por la sobre-activación de las células gliales, principalmente astrocitos y microglia, alrededor de las placas amiloideas (o gliosis) [20]. Una vez activadas, las células gliales producen una gran cantidad de moléculas pro-inflamatorias como citoquinas, factores del complemento y eicosanoides. En este sentido, los niveles de interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8), factores de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) y otras citoquinas normalmente pueden encontrarse incrementados en tejido cerebral de pacientes afectados por la EA [21]. La sobreexpresión de la cascada del complemento también se ha asociado a la EA como un mecanismo protector en la eliminación de las placas seniles mediante fagocitosis [22]. Además, la inflamación mediada por eicosanoides ha demostrado ser una componente esencial en la patofisiología de la EA, inducida por la degradación de las membranas neuronales y posterior oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados liberados en este proceso [23]. Sin embargo, estas respuestas inflamatorias no sólo pueden encontrarse en el sistema nervioso central, sino que se ha demostrado que el sistema inmune periférico también participa en la patogénesis de este desorden neurodegenerativo. Así, estudios previos han documentado niveles anormales de compuestos pro-inflamatorios periféricos [24]. Además, algunos autores sugieren la implicación del sistema inmune adaptativo en la EA, con un aumento de la actividad de las células T y su acumulación en el tejido cerebral [25], así como la participación de la respuesta autoinmune frente a los péptidos A β [26, 27].

1.2.6. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es una situación patológica presente en numerosas enfermedades, causada por un desequilibrio entre la capacidad antioxidante protectora del organismo y los procesos de producción de radicales oxidantes tóxicos, principalmente especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*). En particular, el cerebro humano ha demostrado ser altamente susceptible al estrés oxidativo debido a su elevada actividad metabólica, alta concentración de sustratos fácilmente oxidables, y escasez de compuestos antioxidantes en comparación con otros tejidos. Así, la sobreproducción de radicales oxidantes puede conducir a importantes daños oxidativos en numerosos componentes celulares

como lípidos, proteínas, ADN y ARN, causando graves fallos estructurales y funcionales.

La producción de radicales libres en las regiones cerebrales afectadas por la EA se ha asociado a numerosas fuentes de estrés oxidativo, como la deposición de placas seniles y ovillos neurofibrilares, acumulación de metales, factores genéticos o la activación de la microglia [28]. A su vez, este daño oxidativo puede relacionarse con otros procesos subyacentes a la neuropatología de la EA, incluyendo fallos en el metabolismo energético y disfunción mitocondrial, daños neuronales causados por la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, o producción de compuestos neurotóxicos como 4-hidroxinonenal, malondialdehído y productos de la glicación avanzada. De este modo, numerosos marcadores de estrés oxidativo se han propuesto como potenciales pruebas de diagnóstico de la EA, los cuales pueden detectarse tanto en el sistema nervioso central como en la periferia, sugiriendo la participación del sistema antioxidante sistémico en el desarrollo de la EA [29]. Entre estos posibles biomarcadores se incluyen la producción de isoprostanos, carbonilos proteicos, 3-nitrotirosina, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, bases oxidadas, o niveles disminuidos de antioxidantes, entre otros [30-32].

1.2.7. HOMEOSTASIS DE LOS METALES

Los elementos metálicos juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, viéndose implicados tanto elementos esenciales como especies tóxicas. Estas alteraciones en la metalo-biología asociada a la EA pueden ocurrir a distintos niveles, incluyendo las rutas de captación y liberación de metales, almacenamiento, metabolismo intracelular y procesos regulatorios, por lo que deben considerarse como una consecuencia resultante de una homeostasis metálica anormal a nivel sistémico [33].

La implicación de la homeostasis del hierro, el cobre y el zinc en la patogénesis de la EA ha sido extensamente estudiada, ya que estos metales esenciales participan en las proteopatías características de este desorden neurodegenerativo. Estos metales normalmente se acumulan en los depósitos amiloideos cerebrales [34], ya que promueven la agregación de péptidos A β y la deposición de placas seniles [35]. También se han relacionado con el metabolismo de la APP y su procesado mediante secretasas a través de la ruta

amiloidogénica [35, 36], y además se ha demostrado su participación en las anomalías observadas en la proteína tau, promoviendo su fosforilación e induciendo la agregación en forma de NFT [37, 38]. El estrés oxidativo inducido por metales pesados es otro potencial mecanismo patológico que puede conducir a los procesos neurodegenerativos observados en la EA. Los fallos en la homeostasis de determinados metales activos, principalmente hierro y cobre, pueden generar estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno [39]. Sin embargo, los metales redox inactivos (*e.g.* arsénico, plomo, cadmio) también presentan efectos tóxicos mediante la unión a los grupos sulfhidrilos proteicos y la depleción de los niveles de glutatión [40, 41]. Entre estos elementos tóxicos cabe destacar el aluminio, que se ha relacionado tradicionalmente con la patogénesis de la EA desde que Crapper demostró en 1973 la acumulación de este metal en tejido cerebral de pacientes de EA confirmados histopatológicamente [42]. Este elemento participa en múltiples procesos asociados a la patogénesis de la EA, generando estrés oxidativo e induciendo la producción, polimerización y agregación de péptidos A β , aunque esta hipótesis aún genera una gran controversia [43]. Por último, también se han establecido relaciones entre la EA y diferentes elementos con una función protectora. En este sentido, se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el deterioro cognitivo y los niveles de selenio y la actividad de distintas selenoproteínas en pacientes afectados por la EA [44]. Además, también se ha descrito que el zinc puede jugar un papel neuroprotector frente a la citotoxicidad inducida por A β debido a su capacidad antioxidante, a pesar de sus propiedades neurotóxicas previamente descritas, evidenciando la alta complejidad de los mecanismos patológicos asociados a la EA [45].

Por todo ello, el estudio del contenido de metales en distintas muestras biológicas se ha erigido como una herramienta clave en la investigación de la patogénesis de la EA (ver sección 3.3).

1.3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEMER

1.3.1. CRITERIOS CLÍNICOS DE DIAGNÓSTICO

Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se basa en una combinación de pruebas neuropsicológicas y la exclusión de otras enfermedades neurológicas, psiquiátricas o sistémicas, haciendo uso de

exámenes neurológicos y otras pruebas de laboratorio. Los criterios diagnósticos comúnmente empleados por la comunidad médica y científica son los definidos por el NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*), los cuales se resumen en la Figura 5 [46].

Criterios NINCDS-ADRDA para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

I. Criterios para el diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer probable:

- Demencia, diagnosticada mediante examen clínico y documentada con el miniexamen mental de Folstein, la escala de demencia de Blessed, u otras similares, y confirmada con test neuropsicológicos.
- Deficiencias en dos o más áreas cognitivas.
- Empeoramiento progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas.
- No alteración del nivel de conciencia.
- Comienzo entre los 40 y los 90 años, con mayor frecuencia después de los 65.
- Ausencia de alteraciones sistémicas u otras enfermedades cerebrales que pudieran producir el deterioro progresivo observado de la memoria y de las otras funciones cognitivas.

II. Apoyan el diagnóstico de «enfermedad de Alzheimer probable»:

- Deterioro progresivo de alguna función cognitiva específica (afasia, apraxia, agnosia).
- Alteraciones conductuales y en la realización de las actividades diarias habituales.
- Antecedentes familiares de trastorno similar, especialmente si obtuvo confirmación anatomopatológica.
- Pruebas complementarias:
 - Líquido cefalorraquídeo normal, en las determinaciones estándar.
 - EEG normal, o con alteraciones inespecíficas como incremento de la actividad de ondas lentas.
 - Atrofia cerebral en TAC, objetivándose progresión de la misma en observación seriada.

III. Aspectos clínicos compatibles con el diagnóstico de «enfermedad de Alzheimer probable», tras excluir otras causas de demencia:

- Mesetas en la progresión de la enfermedad.
- Síntomas asociados de depresión, insomnio, incontinencia, ideas delirantes, ilusiones, alucinaciones, accesos emocionales, físicos o verbales, alteraciones de la conducta sexual, pérdida de peso.
- Otras alteraciones neurológicas en algunos pacientes, especialmente en los que se hallan en fase avanzada, como hipertonia, mioclonías o alteración de la marcha.
- Convulsiones, en fase avanzada de la enfermedad.
- TAC cerebral normal para la edad del paciente.

IV. Aspectos que convierten el diagnóstico de «enfermedad de Alzheimer probable» en incierto o improbable:

- Instauración brusca o muy rápida.
- Manifestaciones neurológicas focales como hemiparesia, alteración de la sensibilidad o de los campos visuales, o incoordinación en fases tempranas de la evolución.
- Convulsiones o alteraciones de la marcha al inicio o en fases muy iniciales de la enfermedad.

V. Diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer posible:

- Demencia, con ausencia de otras alteraciones sistémicas, psiquiátricas y neurológicas que puedan causar esa demencia, pero con una instauración, manifestaciones o patrón evolutivo que difieren de lo expuesto para el diagnóstico de «enfermedad de Alzheimer probable».
- Presencia de una segunda alteración, cerebral o sistémica, que podría producir demencia, pero que no es considerada por el clínico como la causa de esta demencia.
- En investigación, cuando se produce deterioro gradual e intenso de una única función cognitiva, en ausencia de otra causa identificable.

VI. Criterios para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer definitiva:

- Criterios clínicos de «enfermedad de Alzheimer probable».
- Comprobación histopatológica, obtenida a través de biopsia o autopsia.

Figura 5. Criterios NINCDS-ADRDA para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (www.iqb.es).

Estos criterios establecen tres categorías diagnósticas según el nivel de confianza alcanzado: diagnóstico probable, posible y definitivo. El diagnóstico probable de la EA requiere la presencia de una demencia típica de

inicio insidioso y progresivo, y la ausencia de otras enfermedades sistémicas o cerebrales que puedan explicar este trastorno cognitivo (*e.g.* enfermedad de Parkinson, demencia multi-infarto, enfermedades tiroideas, etc). Por el contrario, el diagnóstico es posible cuando existen otras enfermedades que pueden explicar el cuadro de demencia pero la EA se considera la causa más probable. Por último, un diagnóstico definitivo de la EA requiere de la confirmación histopatológica.

Las herramientas más importantes que se emplean para llevar a cabo este diagnóstico incluyen la examinación del historial clínico, los test neurológicos, la electroencefalografía, las técnicas de neuroimagen, y análisis de sangre y LCR [47].

- **Historial médico:** esencial para establecer el curso del deterioro cognitivo progresivo. Debe incluir las anomalías en las distintas funciones cognitivas, modo de inicio y patrón de progresión de la demencia, el impacto en las actividades de la vida diaria, comorbilidades, y antecedentes familiares y educacionales.
- **Examen neurológico:** el deterioro en las funciones cognitivas puede evaluarse mediante distintos tipos de examen neurológico, siendo el más empleado la Mini-prueba del estado mental (MMSE, *Mini-Mental State Examination*). Complementariamente, existen otras pruebas para determinar los fallos en la memoria, funciones ejecutivas y funciones instrumentales. Además, es necesario llevar a cabo una evaluación psiquiátrica y de los sistemas motores y sensoriales para excluir otros desórdenes neurológicos.
- **Electroencefalografía:** técnica complementaria de diagnóstico, ya que los pacientes con EA muestran actividad cerebral reducida.
- **Pruebas de neuroimagen:** a día de hoy existen varias técnicas de neuroimagen que permiten detectar los cambios neuropatológicos característicos de la EA [48]. La tomografía axial computerizada (TAC) es la herramienta más empleada, la cual permite descartar la presencia de otras enfermedades como tumores cerebrales, hematoma subdural o hidrocefalia, entre otras. La resonancia magnética también puede usarse para detectar atrofia cerebral (MRI, *magnetic resonance imaging*) o para cuantificar anomalías neuroquímicas (MRS, *magnetic resonance spectroscopy*). Por último, la tomografía de emisión de positrones (TEP)

permite detectar los depósitos de A β , así como medir la disminución de la tasa metabólica cerebral de la glucosa.

- **Análisis de sangre:** los análisis de sangre permiten identificar comorbilidades, factores de riesgo y, en ocasiones, descubrir la causa primaria de la demencia. Además, estos análisis permiten descartar daños cognitivos asociados a un amplio rango de condiciones metabólicas, infecciosas o toxicológicas. Incluyen bioquímica general (glucosa, urea, ácido úrico, triglicéridos, colesterol, función renal y hepática, calcio y fósforo), test de sedimentación, hemograma completo, determinación de la función tiroidea, vitamina B12, ácido fólico, y test serológicos para sífilis, VIH y Borrelia.
- **Análisis de LCR:** determinación de marcadores convencionales de EA (péptidos A β , proteína tau total e hiperfosforilada).

Los criterios NINCDS-ADRDA fueron revisados y actualizados en el año 2007 [49], siendo incorporados en los principales manuales internacionales de diagnóstico (DSM, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; ICD, *International Classification of Diseases*). Estos nuevos criterios no incluyen la designación de EA posible, y establecen que para diagnosticar una EA probable debe cumplirse un criterio clínico central (criterio A) y al menos uno de los criterios adicionales de apoyo (criterios B, C, D, E).

- **Criterio A:** presencia de un deterioro significativo y temprano en la memoria episódica.
- **Criterio B:** atrofia del lóbulo temporal medial (pérdida de volumen de hipocampo, corteza entorrinal y amígdala, determinado mediante MRI).
- **Criterio C:** niveles anormales de biomarcadores convencionales en LCR. Disminución de A β 42 y aumento de proteína tau (total e hiperfosforilada).
- **Criterio D:** patrón metabólico específico determinado mediante TEP (disminución de la tasa metabólica cerebral de la glucosa, agregación de A β y tau).
- **Criterio E:** presencia de mutaciones autosómicas dominantes (APP, PS1, PS2).

Además, se definen una serie de criterios de exclusión que incluyen un inicio repentino de la enfermedad, la presencia de deficiencias neurológicas focales (*e.g.* hemiparesia, pérdida sensorial, déficit visual) o la aparición temprana de deficiencias extrapiramidales, convulsiones o anomalías en la forma de andar. El diagnóstico de la EA probable tampoco es posible cuando existen otros desórdenes que pueden explicar el deterioro cognitivo, como lesiones cerebrovasculares, otros tipos de demencia (*e.g.* demencia de cuerpos de Lewy), delirio, depresión o intoxicaciones.

1.3.2. LA NECESIDAD DE BIOMARCADORES

A pesar de las revisiones y actualizaciones a las que se han sometido los criterios NINCDS-ADRDA en los últimos años, las actuales pruebas de diagnóstico de la EA aún presentan grandes limitaciones. En primer lugar, hay que destacar que la EA sólo puede diagnosticarse de forma probable, ya que el diagnóstico clínico empleado en la actualidad no puede ser confirmado hasta la identificación histopatológica en tejido cerebral *post-mortem* de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Además, este protocolo diagnóstico requiere de la presencia de un deterioro cognitivo significativo (criterio A), lo que imposibilita una detección precoz de la EA y dificulta llevar a cabo intervenciones farmacológicas eficaces, ya que la enfermedad sólo puede detectarse en un estadio avanzado con un daño cerebral generalizado. Por último, se ha demostrado que estos criterios tienen una baja especificidad frente a otras demencias (alrededor del 70%), con una sensibilidad sólo moderada (80%) [50].

Por todo ello, la identificación de biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se ha convertido en uno de los campos de investigación emergentes en biomedicina. Un biomarcador se define como un parámetro fisiológico, bioquímico o anatómico que puede medirse *in vivo* y que refleja alguna característica específica de un proceso patológico. Idealmente, un marcador efectivo de EA debe estar validado en casos confirmados neuropatológicamente y debe ser capaz de medir cambios en cortos periodos de tiempo para estudiar la progresión de la enfermedad. Además debe ser sensible (85%), específico (80%), reproducible, no invasivo; y preferentemente simple y barato. Por último, sería aconsejable que fuese sensible a modificaciones terapéuticas para su aplicación en el desarrollo de nuevos fármacos [51]. El líquido cefalorraquídeo es la matriz normalmente

empleada en la búsqueda de posibles biomarcadores de Alzheimer debido a que refleja fielmente la composición neuroquímica extracelular del cerebro. Sin embargo, la obtención de LCR mediante punción lumbar supone un procedimiento invasivo para el paciente, con un elevado coste económico. Alternativamente, el empleo de muestras no invasivas como suero y plasma sanguíneo, o en menor medida orina y saliva, presenta un gran interés con el fin de obtener métodos de diagnóstico más baratos y simples, sin ningún riesgo para el paciente [52]. En cualquier caso, la elevada complejidad de la etiología asociada a la enfermedad de Alzheimer ha demostrado ser un inconveniente importante para la identificación de biomarcadores fiables. En este sentido, el estudio de la patogénesis de la EA y el descubrimiento de marcadores de diagnóstico se ve dificultado por el largo periodo presintomático de esta enfermedad, la imposibilidad de estudiar los cambios microscópicos hasta la fase final o la variabilidad de la expresión clínica de los síntomas. Además, la búsqueda de estos marcadores se ve obstaculizada por el hecho de que el diagnóstico clínico empleado actualmente no siempre es exacto, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad, por lo que los grupos control empleados en estas investigaciones son susceptibles de contener individuos con EA preclínica [53]. Finalmente cabe destacar que dada la naturaleza multifactorial de esta enfermedad, es poco probable que un único biomarcador sea capaz de satisfacer todas las necesidades para el diagnóstico de la EA, siendo más aconsejable el desarrollo de paneles de biomarcadores.

La búsqueda de posibles biomarcadores de Alzheimer se ha enfocado tradicionalmente en el estudio de los mecanismos patológicos característicos de esta enfermedad. En este sentido, numerosos autores han evaluado la utilidad de moléculas relacionadas con la formación de SP y NFT, el estrés oxidativo o la neuroinflamación como marcadores diagnósticos [16]. Sin embargo, el empleo de técnicas de análisis masivo (o ciencias ómicas) está emergiendo en este campo gracias a su potencial para caracterizar de forma global las alteraciones bioquímicas subyacentes a estos procesos patológicos. Entre estas técnicas ómicas se encuentran la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, cada una de las cuales ha permitido profundizar en el conocimiento de la patogénesis multifactorial asociada a la EA y el descubrimiento de posibles biomarcadores, revelando la implicación de genes, ARN, proteínas y metabolitos [51, 54]. En la Tabla 1 se muestran

algunos de los marcadores que se han descrito hasta la fecha para la detección de la EA. Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado la suficiente sensibilidad y especificidad, por lo que a día de hoy el diagnóstico de la EA se sigue realizando mediante la aplicación de los criterios clínicos previamente descritos.

Tabla 1. Ejemplos de biomarcadores propuestos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

biomarcador	observaciones	Ref.	
marcadores clásicos (deposición de SP y NFT)	A β	↓LCR, ↑sangre	[16]
	Tau total	↑LCR, sangre	
	Tau hiperforforilada	↑LCR, sangre	
marcadores de inflamación	interleucinas (IL-6)	↑LCR, sangre	[24]
	TNF α	↑LCR, sangre	
	α -antiquimiotripsina	↑LCR, sangre	
marcadores de estrés oxidativo	malondialdehido	↑sangre	[29]
	4-hidroxi-nonenal	↑sangre	
	F2-isoprostanos	↑LCR, sangre	[31]
	antioxidantes	↓plasma	[32]
marcadores genómicos	APP	-	[11]
	PS1	-	
	PS1	-	
	APOE	-	
marcadores proteómicos	α -2-macroglobulina	↑LCR, sangre	[55]
	clusterina	↑LCR, sangre	
	transtiretina	↓LCR, sangre	
marcadores metabólicos	N-acetil-aspartato	↓cerebro (MRS)	[51]
	mio-inositol	↑cerebro (MRS)	
	oxisteroles	↑cerebro, LCR	

1.4. MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.4.1. TIPOS DE MODELOS

Los modelos animales son una de las herramientas más importantes en biomedicina para el estudio de la patogénesis de las enfermedades, el descubrimiento de posibles biomarcadores y la evaluación *in vivo* de nuevos tratamientos farmacológicos [56]. En particular, estos modelos presentan una gran utilidad en la investigación de desórdenes neurológicos como la enfermedad de Alzheimer, ya que el estudio del sistema nervioso central en pacientes humanos se ve limitado al análisis de tejido cerebral *post-mortem*, cuando la enfermedad se encuentra en su estadio final, mientras que los modelos animales permiten llevar a cabo estudios en diferentes etapas a lo largo de la progresión de la enfermedad.

Numerosos modelos animales se han propuesto para el estudio de la EA, incluyendo modelos tanto espontáneos como inducidos. Algunas especies desarrollan espontáneamente placas seniles y taupatías con la edad (*e.g.* perros, gatos, delfines, primates), las cuales pueden ir acompañadas de un deterioro cognitivo [57, 58]. Sin embargo, el uso de estos modelos no está generalizado por razones éticas y debido al elevado coste económico. Alternativamente, la inducción de patologías características de la EA mediante fármacos, productos químicos o lesiones cerebrales ha permitido crear modelos enfocados en el estudio de rutas patofisiológicas específicas, como el déficit colinérgico, neuroinflamación o fallos en el metabolismo de la glucosa, entre otros [57]. Sin embargo, los resultados más satisfactorios se han obtenido modelando la EA en organismos transgénicos, incluyendo ratones, ratas y otras especies no mamíferas como el pez cebra (*Danio rerio*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Entre todos ellos, los ratones transgénicos son los modelos más ampliamente utilizados debido a que muestran una neuropatología similar a la observada en pacientes humanos afectados por la EA. Además, como las rutas bioquímicas se conservan a través de la evolución, y son muy similares entre roedores y humanos, los resultados obtenidos en modelos murinos muestran una mayor analogía con la etiología de la enfermedad de Alzheimer en humanos [59].

El descubrimiento de los genes implicados en la patogénesis de la EA (*i.e.* APP, PS1, PS2, APOE) ha permitido desarrollar múltiples modelos transgénicos [60]. El modelo ideal debería mostrar todas las características clínicas y patológicas de la EA, incluyendo los déficits cognitivos y del comportamiento, la formación de SP y NFT, gliosis, pérdida de neuronas y sinapsis, y neurodegeneración. Sin embargo, ningún modelo existente exhibe todas estas características, sino que cada una de las líneas actualmente disponibles presenta una patología única que permite abordar el estudio de los mecanismos asociados a esta enfermedad desde distintos puntos de vista complementarios. La mayoría de los modelos desarrollados se basan en la sobreexpresión de la APP humana, los cuales muestran agregación de péptidos A β a edades avanzadas en hipocampo y corteza cerebral [61]. Sin embargo, se ha demostrado que la co-expresión de formas mutadas de la PS1 y PS2 acelera la deposición amiloidea [62], facilitando así la aparición del fenotipo característico de la EA. Por el contrario, la obtención de modelos con taupatía se ha visto dificultado por el desconocimiento de los genes implicados en este proceso, de modo que los únicos modelos existentes se basan en la mutación de tau responsable de la demencia frontotemporal (DFT), en la que también se observa la deposición de NFT [63]. De este modo, las líneas transgénicas que existen en la actualidad para el estudio de la EA se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- **Modelos APP** (Tg2576, TgCRND8, PDAPP): expresión transgénica de la APP humana. Desarrollan la patología amiloidea y déficits en la memoria, pero no pérdida neuronal.
- **Modelos A β** (BRI- A β 42): producen únicamente péptidos A β , y no otros péptidos generados de la fragmentación de la APP. Para ello, estos ratones expresan una proteína de fusión entre el péptido A β y la proteína BRI, implicada en la demencia familiar británica. Desarrollan la patología amiloidea, pero no se observan déficits cognitivos.
- **Modelos PS y APP \times PS** (APP/PS1, APP/PS2, 5 \times FAD): la mayoría se basan en la mutación de PS1. Los modelos transgénicos simples producen péptidos A β 42, pero no desarrollan la patología característica de la EA. Sin embargo, las líneas múltiples APP \times PS muestran una deposición acelerada de placas seniles y déficits cognitivos significativos.

- **Modelos tau** (TAPP, 3×Tg): expresan la mutación tau asociada a la DFT, normalmente acompañada de mutaciones en APP. Desarrollan las patologías amiloidea y tau, pero de forma independiente.
- **Modelos APOE** (APOE3, APOE4): expresión de isoformas de APOE humana. Desarrollan déficit cognitivo y fallos en la plasticidad sináptica.

1.4.2. EL RATÓN TRANSGÉNICO APP_{swE}/PS1_{ΔE9}

El ratón APP_{swE}/PS1_{ΔE9}, o simplemente APP/PS1, es uno de los modelos transgénicos más ampliamente utilizados en la actualidad para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Este modelo, descrito por primera vez en el año 2004 por Jankowsky *et al.*, se obtiene mediante la sobreexpresión de la mutación sueca de la APP junto a la supresión de PS1 en el exón 9 [64]. Estos ratones reproducen fielmente algunos de los déficits neuropatológicos y cognitivos observados en la EA humana, con un fenotipo caracterizado por la deposición temprana de placas amiloides a partir de los cuatro meses de edad, activación glial, y fallos en las funciones cognitivas a la edad de seis meses [65]. Además, aunque no exhibe pérdida neuronal (como la mayoría de los modelos desarrollados hasta el momento), el ratón APP/PS1 manifiesta una gran variedad de otros síntomas, incluyendo una mortalidad incrementada, déficits en la transmisión colinérgica o actividad neuronal reducida en regiones afectadas por la acumulación de Aβ. Por último, cabe destacar que el perfil neuroquímico y los cambios metabólicos dependientes de la edad observados en APP/PS1 son muy similares a los mostrados por los pacientes de Alzheimer [66], demostrando el potencial de este modelo transgénico para la investigación de los mecanismos patogénicos asociados a la EA.

1.4.3. MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN LOS MODELOS DE ALZHEIMER: EL RATÓN TRANSGÉNICO APP/PS1/IL4-KO

Debido a la gran importancia de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA, en los últimos años se han desarrollado nuevos modelos animales basados en la modulación de distintos componentes inflamatorios [67]. Con el fin de elucidar el papel de la activación microglial en el desarrollo de la EA, se han creado modelos transgénicos con actividad glial modulada mediante la estimulación de diferentes receptores, incluyendo receptores *scavenger* [68,

69], de tipo Toll [70] o de quimioquinas [71]. Además, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios en ratones transgénicos de la EA pueden potenciar la patología, incrementando la producción y agregación de péptidos A β e inhibiendo su eliminación, del mismo modo que la supresión de estos mediadores causa una notable mejoría. Así, algunos de los componentes inflamatorios que han sido investigados son las interleucinas [72], factores de necrosis tumoral [73] o la enzima óxido nítrico sintetasa [74].

Entre estos mediadores, la modulación de la interleucina 4 (IL4) puede tener un gran interés ya que presenta propiedades antiinflamatorias y está implicada en la proliferación de células T y en funciones cognitivas como la memoria o el aprendizaje [75]. Así, la supresión del gen IL4 permite obtener un modelo animal de función inmune deteriorada, el ratón IL4 deficiente o IL4 knockout (IL4-KO), en el cual se ven alteradas las rutas de producción de citoquinas Th2 e inmunoglobulinas E y G1 [76, 77]. En relación con la EA, estudios previos han demostrado la asociación entre polimorfismos de nucleótido simple del gen IL4 y un riesgo incrementado de padecer este desorden neurodegenerativo [78, 79], así como una producción de IL4 reducida en células mononucleares sanguíneas de pacientes con EA [80]. Además se ha comprobado que la inducción de la producción de IL4 reduce la deposición de A β y atenúa la patología asociada a la EA en distintos modelos transgénicos [81, 82]. Por todo ello, el ratón transgénico triple APP/PS1/IL4-KO, obtenido mediante el cruce de las líneas APP/PS1 e IL4-KO, podría ser un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos patológicos asociados a la inflamación en la enfermedad de Alzheimer.

2. LA METABOLÓMICA: CARACTERIZACIÓN GLOBAL DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

2.1. INTRODUCCIÓN A LA METABOLÓMICA

Las técnicas de análisis masivo, o ciencias ómicas, son hoy día una de las herramientas más importantes para el estudio de los sistemas biológicos gracias a su carácter global e interdisciplinar. Entre estas técnicas ómicas se encuentran la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, organizadas según la denominada “cascada de las ómicas” en analogía con el dogma central de la biología (Figura 6), las cuales se basan en el análisis simultáneo y no dirigido del conjunto de todos los componentes biológicos de un sistema (*i.e.* genes, ARN, proteínas y metabolitos, respectivamente).

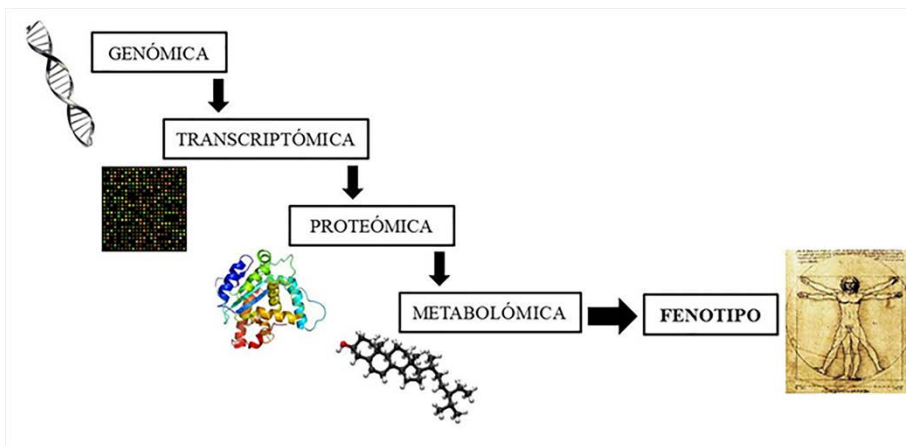


Figura 6. La cascada de las ómicas.

El auge de las técnicas ómicas comenzó con la genómica en la década de 1990, gracias a la iniciación del Proyecto Genoma Humano y la secuenciación del genoma de otros organismos modelo. Sin embargo, la utilidad de la genómica se ve limitada por el hecho de que en muchas ocasiones no se conoce la relación exacta entre la regulación/expresión génica y el funcionamiento de los sistemas celulares, principalmente debido a que la mayoría del ADN es no codificante. Esta falta de comprensión de las consecuencias biológicas de una expresión genética alterada condujo al desarrollo de otras técnicas como la transcriptómica, la proteómica y finalmente la metabolómica. Entre todas ellas, la metabolómica ha demostrado ser una de las herramientas más poderosas para estudiar los

procesos biológicos debido a que los metabolitos pueden considerarse como el nivel de organización biológico más cercano a la expresión fenotípica [83], como se ilustra en la Figura 6.

La metabolómica se define como el estudio del conjunto de todos los metabolitos de un sistema biológico, también denominado metaboloma, y de los cambios metabólicos observados en respuesta a una perturbación genética o medioambiental. El metaboloma está compuesto por un elevado número de metabolitos intra- y extracelulares (moléculas biológicas con un peso molecular inferior a 1500 Da), los cuales participan directamente en los procesos metabólicos. El papel central que los metabolitos juegan en la biología de sistemas confiere una serie de ventajas a la metabolómica frente a otras ciencias ómicas, las cuales pueden resumirse en los siguientes puntos [84].

- La metabolómica es el indicador más fiable del fenotipo de un organismo, ya que los metabolitos representan el punto final de las reacciones bioquímicas, reflejando directamente las interacciones entre la expresión génica, las proteínas y el medioambiente.
- Los cambios en el metaboloma son generalmente más acusados que los observados en otros niveles biológicos como el transcriptoma o el proteoma, lo que repercute en una mayor sensibilidad.
- El elevado dinamismo del metaboloma lo convierte en un indicador instantáneo de las perturbaciones que ocurren en el organismo.
- La metabolómica permite estudiar los cambios asociados a los procesos de control fisiológico y metabólico, ya que muchos metabolitos están implicados en las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas (*e.g.* ATP, acetil-coenzima, glucosa).
- Las técnicas metabolómicas pueden aplicarse en múltiples compartimentos biológicos del organismo estudiado (*e.g.* tejidos, fluidos biológicos), simplemente cambiando el procedimiento de preparación de muestra, lo cual permite investigar de forma global las perturbaciones metabólicas.
- El coste y tiempo de análisis es por lo general menor en metabolómica que en otras técnicas ómicas.

No obstante, la metabolómica es aún una ciencia emergente con algunas limitaciones importantes. El principal reto de la metabolómica es el desarrollo de metodologías capaces de determinar el mayor número posible de metabolitos en un solo análisis. Mientras que los análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos están dirigidos a moléculas con una gran analogía estructural (ADN/ARN y proteínas son polímeros compuestos por 4 nucleótidos y 22 aminoácidos, respectivamente), el metaboloma presenta una gran complejidad que dificulta su medición e identificación [85]. En primer lugar cabe destacar la heterogeneidad química de los metabolitos presentes en cualquier muestra biológica, entre los que pueden encontrarse lípidos, ácidos orgánicos, alcoholes y otros muchos compuestos. Además, el metaboloma está compuesto por metabolitos procedentes de diversas fuentes, incluyendo metabolitos endógenos (sintetizados y metabolizados en el organismo), exógenos (*e.g.* fármacos, nutrientes), así como metabolitos procedentes de la interacción entre distintos organismos (*e.g.* microflora intestinal). Esta diversidad composicional resulta en una gran variabilidad de propiedades físico-químicas, incluyendo peso molecular, polaridad (hidrofobicidad-hidrofilidad), propiedades ácido-base o volatilidad, lo cual implica la necesidad de múltiples enfoques metabolómicos complementarios para obtener una cobertura analítica completa. Otro factor importante es el amplio rango de concentraciones en que se pueden encontrar los metabolitos (desde pM a mM), lo cual dificulta la determinación simultánea de todos ellos. Por último, el dinamismo del metaboloma también debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un experimento metabolómico ya que los perfiles metabólicos sufren de una alta variabilidad temporal (*e.g.* cambios diurnos) e interindividual, en la que intervienen numerosos factores como el sexo, la edad o la dieta.

A pesar de estas limitaciones, la metabolómica ha demostrado una gran aplicabilidad en numerosos campos gracias a su potencial para caracterizar fenotipos complejos afectados por diversas condiciones anormales. Así, algunas de las aplicaciones más relevantes son el estudio de los mecanismos de acción de tóxicos [86], la metabolómica medioambiental [87], y las aplicaciones biomédicas relacionadas con el estudio de los mecanismos subyacentes a la patología de las enfermedades, el descubrimiento de posibles biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos [88].

2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS vs. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La metabolómica requiere de metodologías robustas y reproducibles, con una elevada sensibilidad y precisión, y que permitan el análisis integral del metaboloma. Para ello se han propuesto numerosas plataformas analíticas, entre las que destacan la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), aunque también se han aplicado otras muchas técnicas como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier transform-infrared spectroscopy*) y la espectroscopía Raman [89], así como métodos cromatográficos con detectores distintos a RMN y MS, como por ejemplo el detector de ionización de llama [90].

La RMN ha sido ampliamente utilizada en el campo de la metabolómica debido a su elevada reproducibilidad, carácter no destructivo, requerimientos mínimos de preparación de muestras y rapidez de análisis. Una de las grandes ventajas que presenta frente a otras plataformas metabolómicas es su capacidad para llevar a cabo la identificación estructural de metabolitos, normalmente mediante el empleo de librerías de espectros. Además, es una técnica no discriminante ya que la sensibilidad en RMN no depende de las características físico-químicas de los analitos, como la polaridad o propiedades ácido-base, posibilitando el análisis de un amplio rango de metabolitos [91]. En particular, la metabolómica basada en RMN ha tenido una gran aceptación en la investigación de enfermedades neuronales como la EA ya que permite llevar a cabo estudios *in vivo* de las alteraciones neuroquímicas mediante MRS [92]. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de la resonancia magnética es su baja sensibilidad, limitando su aplicabilidad al estudio de metabolitos de abundancia media-alta. Además, el análisis de muestras complejas produce espectros con un gran número de señales que pueden solapar en un rango pequeño de desplazamientos químicos (≈ 10 ppm), lo que dificulta la identificación de metabolitos individuales.

Alternativamente, la elevada sensibilidad y especificidad de la espectrometría de masas, junto con la capacidad que posee de llevar a cabo estudios tanto cuantitativos como cualitativos, la han convertido en una técnica con un gran potencial en metabolómica [93]. Además, la MS presenta un amplio rango de aplicabilidad gracias a las múltiples configuraciones instrumentales que

pueden emplearse, incluyendo la aplicación paralela de diversos métodos de introducción de muestra (cromatografía líquida y gaseosa, electroforesis capilar) y mecanismos de ionización (electrospray, ionización química), lo cual permite expandir la cobertura analítica del metaboloma. Así, aunque las técnicas basadas en MS normalmente requieren de una etapa de tratamiento de muestra más compleja, y la selección de las condiciones experimentales (*e.g.* sistema de introducción de muestras, fuente de ionización) conlleva la introducción de un sesgo analítico inherente, la MS se ha establecido como la herramienta idónea para la caracterización metabólica de sistemas complejos.

2.3. DISEÑO DE UN EXPERIMENTO METABOLÓMICO BASADO EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Teniendo en cuenta la elevada complejidad del metaboloma, el diseño experimental de un estudio metabolómico es crítico para asegurar resultados fiables y robustos. El esquema de trabajo convencional en un experimento metabolómico integra una serie de etapas genéricas, como se esquematiza en la Figura 7, entre las que se incluyen la recogida y tratamiento de muestras, el análisis metabolómico, el procesado y análisis estadístico de los datos y por último la identificación de los metabolitos discriminantes y la interpretación de los resultados.

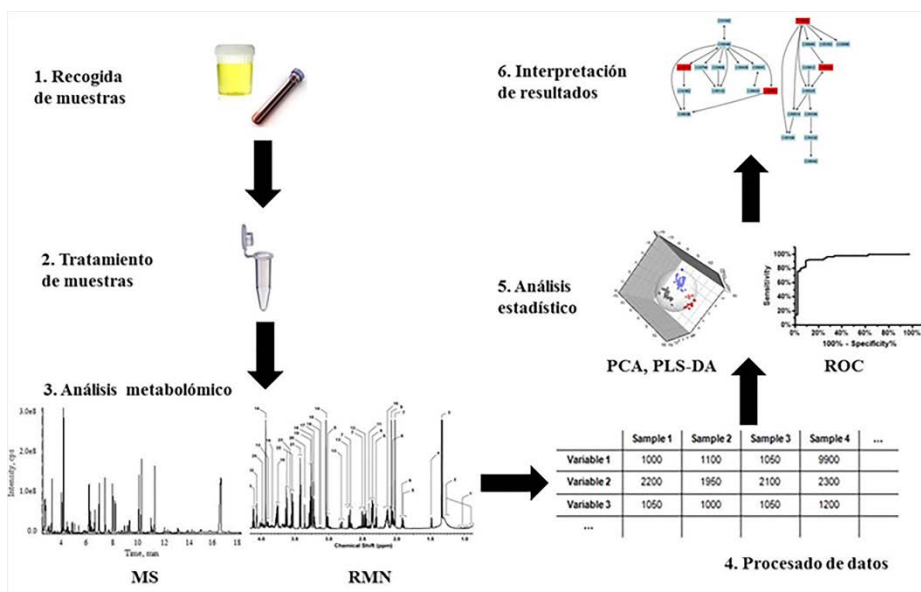


Figura 7. Esquema de trabajo simplificado de un experimento metabolómico.

Todas estas etapas deben ser validadas y optimizadas en función de los objetivos específicos del estudio, prestándose una especial atención a la eliminación de posibles sesgos que puedan conducir a resultados parciales o erróneos. Además, debido al carácter no cuantitativo de las técnicas ómicas, basadas en el análisis comparativo, los métodos metabolómicos deben ser altamente reproducibles con el fin de minimizar la variabilidad inter-muestral, y facilitar así la búsqueda de metabolitos discriminantes entre los grupos de estudio. En cualquier caso, la elevada heterogeneidad del metaboloma normalmente hace necesario el empleo de múltiples plataformas analíticas complementarias para conseguir una cobertura metabolómica global, como se describe en los siguientes apartados.

2.3.1. RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

En metabolómica pueden emplearse numerosos tipos de muestras biológicas, incluyendo fluidos como suero y plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva, así como tejidos y células, cada uno de los cuales posee un metaboloma característico [94-97]. El tamaño poblacional es un factor clave para reducir la influencia de la variabilidad biológica inter-muestral y así poder obtener datos válidos estadísticamente [98]. En experimentos de laboratorio (*e.g.* ensayos de exposición en animales modelo), donde las condiciones experimentales están altamente controladas, el número de muestras suele ser pequeño ya que el factor estudiado es la única variable aleatoria. Sin embargo, en epidemiología (*e.g.* estudio de biomarcadores de enfermedades) el tamaño muestral debe aumentar para corregir posibles factores de confusión como diferencias asociadas a la edad, sexo, dieta o hábitos de vida.

Tras la recogida de las muestras, estas deben ser sometidas a un proceso de desactivación metabólica (*quenching*) para evitar que los metabolitos sufran posteriores transformaciones. Esto normalmente se consigue mediante una disminución brusca de la temperatura con nitrógeno líquido, mientras que en estudios con líneas celulares suelen emplearse disolventes orgánicos o soluciones salinas para evitar la fuga de metabolitos por ruptura celular [93].

Por último, los procedimientos de tratamiento de muestra empleados en metabolómica deben ser simples y universales para evitar la introducción de sesgos (*e.g.* pérdidas de metabolitos, empleo de procesos de extracción

selectivos) [99]. En el caso de tejidos es necesaria la liberación de los metabolitos intracelulares mediante homogeneización y lisis celular, mientras que el tratamiento de fluidos biológicos normalmente se ve limitado a una etapa de desproteinización y/o dilución para reducir el efecto matriz [100, 101]. Alternativamente, la extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) también se ha propuesto en numerosas ocasiones para realizar la extracción y purificación de fluidos biológicos de manera simultánea, haciendo uso de múltiples materiales adsorbentes incluyendo fase reversa, fase normal y resinas de intercambio iónico [102, 103]. Sin embargo la extracción de modo mixto (MM, *mixed mode*), que aúna diferentes mecanismos de retención mediante la incorporación de varios ligandos en un mismo soporte, es la que presenta un mayor potencial en metabolómica gracias a su capacidad de extraer una mayor fracción de metabolitos [104]. Finalmente, la extracción líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) también ha sido considerada para la recuperación de metabolitos de baja polaridad en muestras con un alto contenido salino como la orina, aunque es una técnica inusual en metabolómica [105].

❖ DERIVATIZACIÓN

En el caso particular de análisis metabolómico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el tratamiento de muestras debe ir acompañado de una etapa de derivatización. El objetivo principal de este proceso es la volatilización de compuestos polares, aunque también permite estabilizar metabolitos térmicamente lábiles así como mejorar la eficiencia del proceso cromatográfico y la forma de pico.

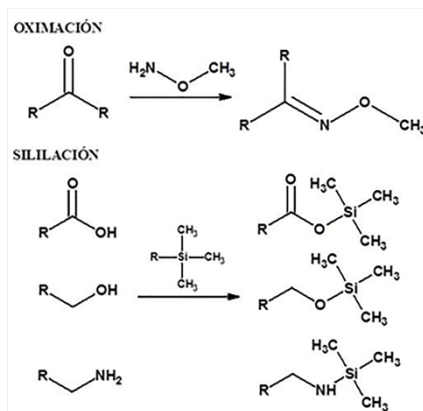


Figura 8. Esquema del procedimiento de derivatización mediante oximación y sililación.

El procedimiento de derivatización comúnmente empleado en metabolómica consta de dos etapas [106], como se esquematiza en la Figura 8. En primer lugar se lleva a cabo la oximación de los grupos carbonilos, usando clorhidrato de metoxiamina, con el fin de inhibir la ciclación de los azúcares, proteger los compuestos α -cetoácidos frente a la descarboxilación y fijar los grupos carbonilos enolizables. A continuación, la derivatización de los metabolitos polares normalmente se realiza mediante sililación, ya que es el procedimiento más versátil y universal. El principal inconveniente de este procedimiento es la inestabilidad que presentan los reactivos sililantes y los productos sililados frente al agua y otros disolventes próticos, lo que ha conducido al desarrollo de procedimientos alternativos que pueden emplearse en medios acuosos (*e.g.* cloroformiato de etilo). En metabolómica, los agentes derivatizantes más comunes son los reactivos de trimetilsililación, entre los que se encuentran la N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) y N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA), con un amplio rango de aplicabilidad y similar poder derivatizante. En ocasiones estos derivatizantes pueden ir acompañados de un catalizador, normalmente trimetilsilil-clorosilano (TMCS), aunque algunos autores sugieren que su uso no mejora significativamente el rendimiento de la derivatización [107]. Además, existen otros reactivos más selectivos como el trimetilsilil-imidazol (TMSI) o hexametil-disilazano (HMDS), empleados para derivatizar grupos impedidos estéricamente, o el cloruro de tert-butil-dimetilsililo (TBDMS-Cl), menos sensible a la hidrólisis que los reactivos de sililación convencionales.

2.3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se ha descrito anteriormente, no existe ninguna técnica analítica que permita estudiar la totalidad del metaboloma de forma simultánea, siendo necesario el empleo de diferentes plataformas complementarias para conseguir una amplia cobertura analítica. En este sentido, la espectrometría de masas presenta un gran potencial gracias a las múltiples conformaciones instrumentales existentes, entre las que se incluyen distintos sistemas de introducción de muestra, fuentes de ionización y analizadores de masas.

❖ INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

Las plataformas metabolómicas más empleadas en la actualidad se basan en el acoplamiento de distintas técnicas de separación a un espectrómetro de masas, entre las que destacan la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*), la cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) y la electroforesis capilar (CE, *capillary electrophoresis*) [108, 109].

El acoplamiento GC-MS fue desarrollado mucho antes de la introducción de otras técnicas basadas en separaciones en fase líquida gracias a la compatibilidad entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, ya que ambas operan en fase gaseosa. Por ello, esta plataforma ha jugado un papel muy relevante en los inicios de la metabolómica. En general, la mayoría de los métodos metabolómicos basados en GC-MS emplean ionización por impacto electrónico (EI, *electron impact*), y en menor medida ionización química (CI, *chemical ionization*). La separación cromatográfica normalmente se lleva a cabo en columnas capilares con fase estacionaria de polaridad baja (5% difenil-polidimetilsiloxano) o media (50% difenil-polidimetilsiloxano), haciendo uso de programas de temperatura prolongados que comienzan con temperaturas inferiores al punto de ebullición del disolvente, hasta alcanzar 300-320°C. Alternativamente, los métodos cromatográficos bidimensionales (GC×GC-MS) permiten aumentar la eficiencia de la separación en muestras complejas. Para ello, cada pico eluyente de una primera columna, normalmente no polar, se transfiere a una segunda columna (polar), lo que permite llevar a cabo separaciones en función tanto de la volatilidad como de la polaridad de los metabolitos analizados. Una de las ventajas más importantes del acoplamiento GC-MS es su capacidad para identificar picos desconocidos mediante el empleo de librerías de espectros, lo cual es posible gracias a la reproducibilidad que se consigue en los procesos de fragmentación mediante el uso de EI. Además, la reproducibilidad y resolución cromatográfica es por lo general superior a la que se obtiene con otros acoplamientos como LC-MS y CE-MS. Sin embargo, la mayor limitación de esta plataforma es que está restringida al análisis de compuestos volátiles y térmicamente estables, lo cual normalmente requiere de una etapa previa de derivatización (sección 2.3.1) que puede introducir una mayor variabilidad técnica y complejidad analítica. Por lo tanto, el acoplamiento GC-MS sólo puede emplearse para obtener perfiles metabolómicos de compuestos de bajo peso molecular.

La introducción de las fuentes de ionización a presión atmosférica (API, *atmospheric pressure ionization*) en la década de 1990 permitió el desarrollo de los acoplamientos LC-MS, los cuales muestran un mecanismo de separación complementario a GC-MS. A pesar de que la supresión iónica es un problema importante en LC-MS, esta plataforma se ha convertido en la herramienta metabolómica más empleada hoy día gracias a su amplio rango de aplicabilidad. En este sentido, las técnicas basadas en LC-MS permiten analizar compuestos de naturaleza química muy diversa, desde metabolitos de bajo peso molecular hasta compuestos de mayor tamaño como lípidos, péptidos o sacáridos, para lo cual pueden emplearse diversas fases cromatográficas con mecanismos de retención complementarios. La cromatografía de fase reversa (RP, *reversed phase*) es la modalidad más empleada en metabolómica ya que la mayoría de los metabolitos conocidos son de naturaleza hidrofóbica (>70%), principalmente lípidos (*e.g.* fosfolípidos, esteroides, glicerolípidos). Por el contrario, el análisis de la fracción metabólica polar normalmente se lleva a cabo mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction chromatography*), una técnica similar a la cromatografía en fase normal (NP, *normal phase*) en la que la fase móvil no acuosa empleada en NP se reemplaza por un eluyente que contiene disolventes orgánicos miscibles con el agua, lo cual facilita su acoplamiento a MS. Una alternativa para el análisis del metaboloma polar es el empleo de reactivos de pares iónicos, que permiten separar metabolitos hidrofílicos en fases estacionarias hidrofóbicas. La cromatografía líquida abarca una amplia gama de distintos sistemas instrumentales atendiendo a la longitud de la columna y el tamaño de partícula. Las técnicas convencionales basadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) han sido extensamente aplicadas en metabolómica, pero la resolución cromatográfica que proporciona no es suficiente para resolver la elevada complejidad del metaboloma. Por ello, algunos autores han propuesto el uso de la cromatografía líquida capilar para conseguir una mayor sensibilidad y resolución, así como menores requerimientos de cantidad de muestra y disolventes [108]. Sin embargo, estas columnas poseen una limitada capacidad de carga, lo cual es incompatible con el análisis integral de la totalidad del metaboloma. Actualmente, la plataforma más empleada en metabolómica es la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, *ultra high-performance liquid chromatography*), la cual permite realizar

separaciones más eficientes gracias al uso de fases estacionarias con tamaño de partícula inferior a 2 μm . Así, se ha demostrado que la UHPLC mejora la reproducibilidad de la separación cromatográfica, aumenta la sensibilidad y resolución de pico, y reduce el tiempo total de análisis, como puede observarse en la Figura 9 [110].

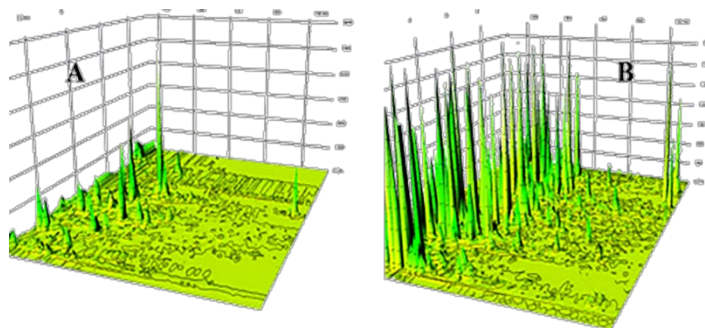


Figura 9. Cromatogramas tridimensionales (tiempo de retención vs. m/z vs. intensidad) obtenidos mediante análisis por HPLC-MS (izquierda) y UHPLC-MS (derecha) de una misma muestra de orina [110].

Por último, el acoplamiento CE-MS ha demostrado un gran potencial para el análisis de metabolitos altamente polares e iónicos, los cuales no pueden resolverse mediante GC-MS o LC-MS. Algunas de las ventajas que presenta esta técnica son su elevada resolución de separación y el requerimiento de pequeños volúmenes de muestra con un pre-tratamiento mínimo [111]. Además, la disponibilidad de múltiples modos de separación permite abordar de forma más exhaustiva el estudio de la totalidad del metaboloma, entre los que destacan la electrophoresis capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*) y la electrocromatografía capilar (CEC, *capillary electrochromatography*). Sin embargo, la aplicación de esta plataforma no es tan común en metabolómica como GC/LC-MS debido a la irreproducibilidad en los tiempos de migración y a la dificultad de acoplar CE con MS, lo cual repercute en una baja robustez analítica. A pesar de estas limitaciones, CE-MS está emergiendo en los últimos años como una herramienta metabolómica complementaria a tener en cuenta, con un gran potencial para la caracterización del metaboloma polar en muestras con un gran contenido acuoso (*e.g.* orina, LCR), como se muestra en la Figura 10 [112]. En la mayoría de las aplicaciones se emplean capilares de sílice

descubiertos, aunque también se ha propuesto el uso de distintos tipos de recubrimientos para tener un mayor control del flujo electroosmótico así como para reducir la adsorción de analitos en la pared interna del capilar [113]. Otro factor a tener en cuenta es la interfaz de acoplamiento entre CE y MS. La interfaz con flujo adicional (*sheath-liquid interface*) es el formato más habitual, donde la conexión se consigue mediante un tubo coaxial a través del cual se introduce un disolvente de envoltura que permite generar un aerosol más estable durante la ionización en MS. Por el contrario, en la modalidad sin flujo adicional (*sheathless interface*) el eluyente de la CE se introduce directamente en el MS, lo que proporciona una mejor sensibilidad pero genera una mayor inestabilidad de la señal.

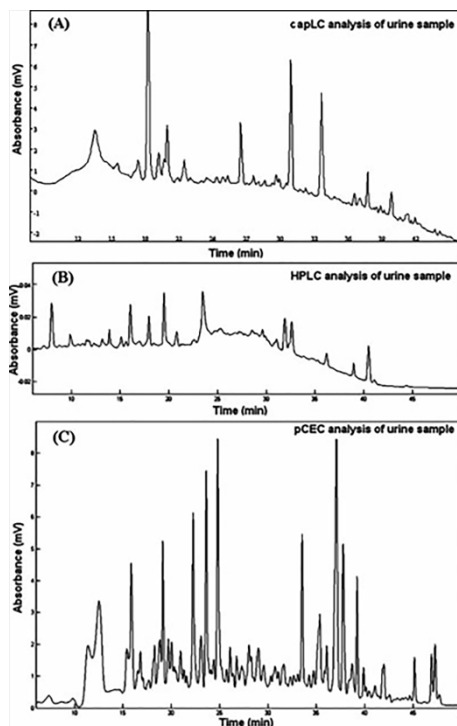


Figura 10. Comparación de cromatografía líquida capilar (A), HPLC (B) y CE (C) para el análisis del metaboloma polar de muestras de orina [112].

La aplicación de estas técnicas cromatográficas y electroforéticas previas a la detección por MS permite resolver un gran número de metabolitos, y facilita la identificación y cuantificación de los mismos gracias al conocimiento de la masa exacta, espectros de fragmentación y tiempos de retención/migración.

Sin embargo, estos acoplamientos presentan una serie de limitaciones asociadas al elevado tiempo de análisis y el requerimiento de un control exhaustivo de las condiciones de separación para asegurar una buena reproducibilidad analítica, lo que ha conducido al desarrollo de metodologías complementarias con un mayor rendimiento analítico. Entre ellas destacan las técnicas de introducción directa de muestras en MS, ya sea mediante infusión directa (DI, *direct infusion*) o análisis por inyección en flujo (FIA, *flow injection analysis*) [114], y en menor medida las técnicas de ionización ambiental, que permiten el análisis directo de muestras sólidas o aerosoles líquidos sin necesidad de ningún pretratamiento [115]. Estas plataformas metabolómicas de análisis directo permiten un procesado de muestras más rápido, lo cual reduce la deriva instrumental a lo largo del periodo de análisis y en consecuencia aumenta la reproducibilidad inter-muestral. Además, la ausencia de una etapa previa de separación cromatográfica/electroforética posibilita la determinación de múltiples metabolitos de naturaleza muy diversa, ya que se evita el sesgo analítico inherente asociado a la selectividad de los mecanismos de retención de las distintas técnicas de separación. Por último, cabe destacar que la introducción directa de muestras en MS facilita el diseño del experimento metabolómico en términos de una mayor simplicidad instrumental (evitándose problemas asociados al deterioro gradual de columnas y capilares), y del posterior procesado de datos. Sin embargo, estas técnicas también presentan importantes inconvenientes relacionados con la imposibilidad de diferenciar compuestos isobáricos, la dificultad de obtener datos cuantitativos debido a la presencia de supresión iónica y la detección de iones producidos mediante fragmentación *in-source*. A pesar de estas limitaciones, las técnicas basadas en DI/FIA-MS han demostrado ser una herramienta idónea para realizar un primer *screening* metabolómico rápido y sencillo.

❖ TÉCNICAS DE IONIZACIÓN

Otro gran potencial del empleo de la espectrometría de masas en metabolómica es la disponibilidad de múltiples técnicas de ionización complementarias, como se muestra en la Figura 11. De este modo, aunque cada una de estas técnicas individuales introduce un sesgo analítico inherente al mecanismo de ionización, la combinación de distintas metodologías permite obtener una visión más completa del metaboloma [116-118].

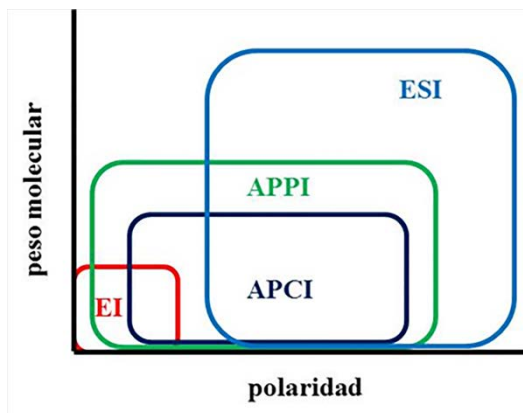


Figura 11. Complementariedad de las técnicas de ionización más empleadas en metabolómica.

El impacto electrónico (EI) es la técnica de ionización comúnmente aplicada en GC-MS, en la cual los analitos son ionizados mediante una corriente de electrones emitidos desde un filamento que al interactuar con los compuestos en fase gaseosa provoca la formación de iones radicales mediante la pérdida de un electrón (M^+). Además, el empleo de una alta energía de ionización (normalmente 70 eV) provoca que el proceso de ionización vaya acompañado por la fragmentación de los analitos. Estos patrones de fragmentación son característicos de cada metabolito, lo cual facilita la identificación de compuestos en los perfiles GC-MS mediante el empleo de librerías de espectros. Alternativamente, la ionización química (CI) puede emplearse para determinar el ion molecular, habitualmente ausente en los espectros EI-MS debido a la alta fragmentación, aunque su uso en metabolómica no se encuentra tan extendido.

En el caso de las plataformas metabolómicas basadas en sistemas de introducción de muestra en fase líquida (*i.e.* LC-MS, CE-MS, DI/FIA-MS) pueden emplearse diversas fuentes de ionización a presión atmosférica. Estas técnicas de ionización permiten obtener iones cargados positiva o negativamente dependiendo del potencial eléctrico aplicado y de las propiedades físico-químicas de los metabolitos, por lo que generalmente los análisis metabolómicos se realizan por duplicado empleando ambos modos de ionización para conseguir una visión más completa del metaboloma investigado. La técnica más común es el electrospray (ESI, *electrospray ionization*), gracias a su elevada sensibilidad, capacidad de ionizar

compuestos en un amplio rango de masas y polaridades, así como su fácil acoplamiento a LC, CE o DI/FIA. En la fuente ESI, la ionización de los metabolitos se produce mediante reacciones ácido-base (*e.g.* $[M+H]^+$, $[M-H]^-$) o de coordinación (*e.g.* $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$), y posterior electro-nebulización para liberar los iones desolvatados. La ionización por electroespray normalmente opera a flujos de introducción de muestra de $\mu\text{L min}^{-1}$, pero la modalidad de nanoelectrospray (nESI) permite introducir menores caudales (nL min^{-1}), lo que facilita el proceso de desolvatación y mejora la sensibilidad. Sin embargo, la nESI no se ha aplicado de forma rutinaria en metabolómica, aunque ha demostrado un gran potencial para la puesta a punto de tecnologías chip basadas en infusión directa de pequeños volúmenes de plasma sanguíneo [119]. Una segunda alternativa es la ionización química a presión atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*), donde la fase móvil se vaporiza e ioniza mediante una descarga en corona, generándose iones reactivos que pueden transferir la carga a los metabolitos en fase gaseosa. Esta técnica de ionización es complementaria a ESI, ya que es más adecuada para el análisis de metabolitos de menor polaridad y además es menos susceptible a efectos de matriz. Por último, la fotoionización a presión atmosférica (APPI, *atmospheric pressure photoionization*) permite ampliar la gama de compuestos analizables en MS ya que es capaz de ionizar compuestos tanto polares como no polares mediante distintos mecanismos de ionización, por lo que puede considerarse como una fuente de ionización universal. Además, presenta una baja susceptibilidad a la supresión iónica, un amplio rango lineal, y requiere menor temperatura que APCI para la desolvatación, permitiendo el análisis de compuestos térmicamente lábiles. La fuente APPI emplea una lámpara de fotoionización y un flujo de dopante para formar iones radicales que pueden ionizar directamente los metabolitos no polares mediante reacciones de intercambio de carga. Alternativamente, en el caso de metabolitos de alta polaridad, los radicales del dopante pueden producir especies reactivas intermedias mediante reacciones con el disolvente o moléculas de oxígeno, seguido por una reacción de transferencia protónica con los analitos [120]. Así, para llevar a cabo el análisis simultáneo de metabolitos de diversa polaridad mediante APPI, los dos mecanismos de ionización deben ser accesibles, lo cual requiere de una cuidadosa selección del disolvente, el dopante y los caudales empleados. En primer lugar, el tipo de fase móvil puede conducir a un mecanismo preferencial de ionización,

favoreciéndose el intercambio de carga cuando se emplean disolventes de baja afinidad protónica, mientras que la adición de metanol o acetonitrilo inicia la transferencia protónica [121]. Entre los dopantes el más común es el tolueno, pero en presencia de disolventes con alta afinidad protónica no es adecuado para la ionización de metabolitos no polares ya que tiende a transferir su protón, por lo que se han propuesto otros dopantes menos reactivos con el disolvente, como el anisol [122] o bencenos sustituidos [123]. Por último, cabe destacar que la eficiencia de la fotoionización disminuye al incrementar el flujo de fase móvil, debido a la formación de grandes agrupaciones no reactivas de moléculas de disolvente, mientras que la sensibilidad mejora al aumentar la cantidad de dopante añadido [124].

❖ ANALIZADORES DE MASAS

El analizador de masas es otro componente a tener en cuenta cuando se diseña un experimento metabolómico basado en MS [125], ya que repercute directamente en aspectos analíticos tan importantes como la sensibilidad, resolución y exactitud de masa, y velocidad de adquisición de espectros, lo cual es clave para la detección de picos estrechos (*e.g.* GC-MS, UHPLC-MS).

Los analizadores de masas nominales, como el cuadrupolo (Q, *quadrupole*) o la trampa de iones (IT, *ion trap*), son extremadamente robustos y reproducibles, y ofrecen un rápido escaneo en amplios rangos de masas. Sin embargo, las plataformas metabolómicas más empleadas en la actualidad se basan en la espectrometría de masas de alta resolución, la cual permite obtener perfiles metabolómicos más resueltos y facilitan la posterior identificación de los metabolitos. El tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) es el analizador de alta resolución más sencillo, el cual ofrece una elevada sensibilidad, exactitud de masa (5 ppm) y capacidad de escaneo rápido. Alternativamente, el sistema híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) combina la estabilidad del cuadrupolo con la elevada resolución del analizador TOF, lo que le confiere una mayor exactitud de masa y permite llevar a cabo experimentos de fragmentación MS/MS [126]. Por último, los analizadores Orbitrap y de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) proporcionan la mayor resolución y exactitud de masa, pero tienen un coste muy superior a los sistemas convencionales basados en TOF.

2.3.3. PRE-PROCESAMIENTO DE DATOS METABOLÓMICOS

Los experimentos metabolómicos generan grandes conjuntos de datos de una elevada complejidad, los cuales deben ser organizados en forma de matrices bidimensionales para facilitar su posterior análisis estadístico e interpretación. Para llevar a cabo este pre-procesamiento de los datos, en la actualidad existen numerosos softwares, tanto de acceso libre (XCMS, MZmine) como desarrollados por los propios fabricantes de sistemas MS (MassHunter, Agilent; MarkerLynx, Waters; MarkerView, Applied Biosystems).

El procedimiento típico para procesar los datos metabolómicos obtenidos mediante técnicas basadas en acoplamiento con MS (*i.e.* GC-MS, LC-MS, CE-MS) consta de varias etapas [127], como se esquematiza en la Figura 12.

- 1) **Detección de picos:** en primer lugar se debe llevar a cabo la identificación de todas las señales presentes en los perfiles metabolómicos causadas por metabolitos reales, eliminando otras señales espurias. Para ello, los datos deben ser filtrados para reducir el ruido instrumental, y a continuación se seleccionan los picos por encima de una relación señal-ruido de corte, para lo cual pueden emplearse distintas estrategias (*e.g.* métodos vectorizados, métodos de ajuste polinomial según la función Gaussiana).
- 2) **Alineamiento:** corrección de la variabilidad inter-muestral en los tiempos de retención.
- 3) **Normalización:** eliminación de fuentes de variación sistémica entre muestras (*e.g.* cambios en la sensibilidad instrumental, diferencias en el factor de dilución de las muestras) a fin de garantizar que los distintos cromatogramas/electroferogramas son comparables.

Por el contrario, el tratamiento de datos en DI/FIA-MS es mucho más simple ya que la ausencia de una separación cromatográfica hace innecesario llevar a cabo la etapa de alineamiento. De este modo, el pre-procesamiento se ve limitado a la búsqueda de los picos presentes en los espectros de masas por encima de un umbral de ruido instrumental.

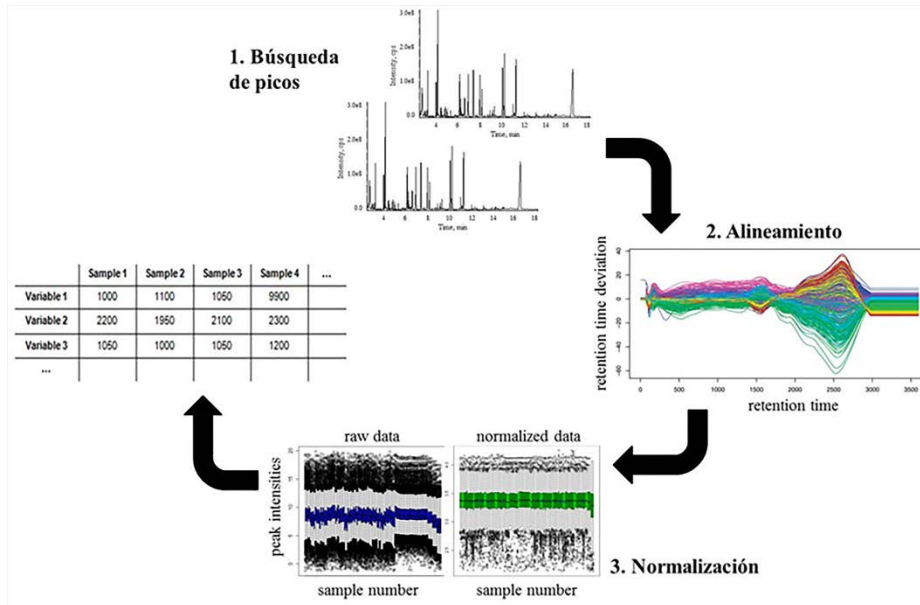


Figura 12. Esquema del procedimiento para el pre-procesado de datos metabolómicos.

2.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS METABOLÓMICOS

La interpretación de los datos obtenidos en un estudio metabolómico requiere de la aplicación de herramientas estadísticas avanzadas, debido al elevado número de muestras y variables analizados en estos experimentos. Normalmente, este tratamiento de datos se basa en el empleo de técnicas de análisis multivariante, las cuales permiten reducir la elevada complejidad de las matrices de datos metabolómicas. Sin embargo, estos resultados deben ser posteriormente validados mediante otras técnicas clásicas de análisis univariante.

Antes de llevar a cabo el análisis estadístico es esencial hacer un pre-tratamiento de los datos para minimizar posibles fuentes de variabilidad técnica inter-muestral, y así facilitar la obtención de resultados biológicamente válidos. Las etapas más importantes de este pre-tratamiento son la transformación, el escalado y la imputación de los valores perdidos (*missing values*). La transformación de los datos, normalmente logarítmica, permite corregir la heterocedasticidad, convertir relaciones multiplicativas en aditivas, y aproximar distribuciones asimétricas a la normalidad [128]. Por el contrario, los métodos de escalado permiten reducir la importancia relativa de

las variables mayoritarias frente a las minoritarias, los cuales se basan en dividir cada variable por un factor de corrección denominado factor de escalado. El método más empleado en metabolómica es el escalado de Pareto, donde el factor de escalado empleado es la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable. Por último, la detección de *missing values* en metabolómica basada en MS es muy común, y puede tener múltiples orígenes (*e.g.* heterogeneidad entre muestras, problemas técnicos, metabolitos minoritarios). Estos *missing values* pueden interferir negativamente en el posterior tratamiento estadístico de los resultados, por lo que se han propuesto distintos métodos para llevar a cabo su imputación [129].

Tras este pre-tratamiento, una gran variedad de técnicas multivariantes pueden ser empleadas para extraer la información biológica de estos datos, entre las que destacan las técnicas de proyección, basadas en la conversión de una matriz de datos multidimensional en un modelo simplificado gracias a la reducción del elevado número de variables mediante la obtención de nuevas componentes, combinaciones de las originales [130]. Estos modelos permiten detectar valores atípicos (*outliers*), así como visualizar agrupaciones y tendencias entre los distintos grupos de estudio, facilitando la interpretación de los resultados. Una de las herramientas más empleadas en metabolómica es el análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*), un método no supervisado donde el modelo estadístico se construye sin un conocimiento previo de la pertenencia de las distintas muestras a cada grupo de estudio. El PCA suele aplicarse como un primer paso exploratorio para evaluar de forma preliminar la calidad de los datos, pero normalmente se requiere del empleo de técnicas supervisadas para mejorar la separación entre grupos y así poder identificar las variables discriminantes. Entre los métodos supervisados, donde el modelado se realiza con un conocimiento previo de la existencia de distintas clases, cabe destacar el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, *partial least squares discriminant analysis*).

Aunque estas técnicas multivariantes presentan un gran potencial para llevar a cabo la clasificación de grupos y la selección de posibles metabolitos discriminantes, los resultados obtenidos deben ser validados mediante la aplicación de otras técnicas complementarias. Una forma de evaluar el poder discriminante de estos metabolitos es mediante el empleo de herramientas estadísticas univariantes paramétricas, como el test t de Student o el análisis

de la varianza (ANOVA, *analysis of variance*), o no paramétricas (e.g. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Sin embargo, la técnica más empleada para descubrir potenciales biomarcadores es el análisis de curvas características operativas del receptor (ROC, *receiver operating characteristic*). La curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad de un posible marcador frente a (1-especificidad), de modo que el área bajo esta curva (AUC, *area under the curve*) puede emplearse para evaluar su potencial diagnóstico [131]. De este modo, un biomarcador se considera excelente cuando el valor de AUC supera 0.9, bueno si se encuentra en el rango 0.8-0.9, moderado entre 0.7-0.8 y pobre si AUC es menor a 0.7.

2.3.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Una vez se han seleccionado las señales discriminantes mediante la aplicación de herramientas estadísticas, estos metabolitos marcadores deben ser identificados. En el caso de metabolómica basada en MS de alta resolución, la elucidación estructural puede llevarse a cabo mediante el conocimiento de la masa exacta y los perfiles de fragmentación. Para ello, existen numerosas bases de datos que permiten realizar la identificación mediante la comparación con espectros de referencia. En GC-EI-MS, el uso de librerías es muy común gracias a la elevada reproducibilidad del proceso de fragmentación por impacto electrónico, entre las que destaca la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, *National Institute of Standards and Technology*). Por el contrario, los espectros de fragmentación obtenidos mediante API-MS varían según el tipo de fuente de ionización y el analizador de masas empleado, lo que ha dificultado el desarrollo de librerías para la identificación de metabolitos detectados en LC/CE/DI-MS. Sin embargo, actualmente existen distintas bases de datos metabolómicas de acceso libre que facilitan este proceso de identificación, como la Human Metabolome DataBase (HMDB, <http://www.hmdb.ca>), Metlin (<http://metlin.scripps.edu>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>) o Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>). Además, cabe destacar que la elucidación estructural de compuestos lipídicos es por lo general más sencilla que la identificación de metabolitos de bajo peso molecular, gracias al conocimiento de los perfiles característicos de fragmentación de las distintas familias de lípidos, como por ejemplo

fosfolípidos [132], esfingolípidos [133], derivados del colesterol [134] o glicerolípidos [135].

Tras esta identificación mediante el uso de bases de datos, la *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) establece que una identificación definitiva requiere del empleo de patrones auténticos para confirmar, al menos, dos características independientes (*e.g.* masa exacta, perfil de fragmentación, tiempo de retención/migración) [136]. Sin embargo, esta metodología no siempre es posible, ya que muchos metabolitos no están disponibles comercialmente o no tienen la pureza necesaria para su análisis por MS [137].

2.3.6. ROBUSTEZ DEL PROCEDIMIENTO METABOLÓMICO

La robustez del procedimiento analítico es un requerimiento básico en metabolómica para asegurar que la variabilidad técnica es menor a la variabilidad inter-muestral, y así poder extraer información biológica válida de los datos obtenidos. La estrategia más común para llevar a cabo la validación de los procedimientos metabolómicos se basa en el empleo de muestras de control de calidad (QC, *quality control*). Estas muestras QC normalmente se preparan mezclando alícuotas de cada una de las muestras individuales, y luego se analizan al principio de la secuencia de análisis para equilibrar el sistema, así como en puntos intermitentes a lo largo de la secuencia para monitorizar la estabilidad instrumental [138].

Una forma directa de evaluar la reproducibilidad instrumental es mediante el empleo de técnicas de análisis multivariante no supervisadas, como el PCA, y la inspección de los correspondientes gráficos de puntuaciones (*scores plots*). Como la variabilidad biológica entre QCs es nula, y la única dispersión posible es la debida a factores técnicos, estas muestras deben quedar estrechamente agrupadas en el PCA (Figura 13A) [139]. Además, la predicción de estas muestras QC en modelos supervisados (*e.g.* PLS-DA) debe causar su clasificación en el centro del gráfico de puntuaciones, ya que su composición es un promedio de la de los distintos grupos investigados (Figura 13B).

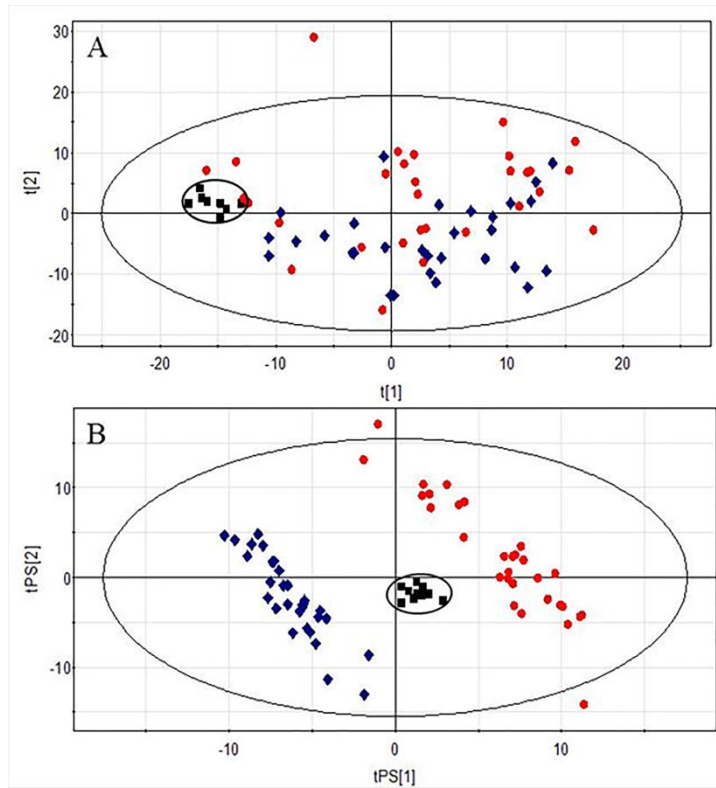


Figura 13. Validación de un método metabolómico mediante el empleo de muestras de control de calidad (cuadrados negros). (A) agrupación de QCs en PCA; (B) predicción de QCs en PLS-DA.

Alternativamente, otra estrategia para evaluar la robustez de un experimento metabolómico es la determinación del coeficiente de variación para distintos metabolitos en muestras QC. Así, los criterios definidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) establecen un límite de variabilidad del 30% para la validación de procedimientos analíticos no dirigidos [140].

2.4. APLICACIÓN DE TÉCNICAS METABOLÓMICAS EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La investigación de la enfermedad de Alzheimer se ha visto tradicionalmente dificultada por el carácter multifactorial de este desorden neurodegenerativo. Sin embargo, la metabolómica ha demostrado un gran potencial en los últimos años para estudiar los mecanismos patológicos subyacentes a esta enfermedad, así como en el descubrimiento de posibles biomarcadores de diagnóstico, gracias a la capacidad que presenta esta técnica de análisis masivo para proporcionar una visión global del estado de los sistemas biológicos. En este sentido, numerosos autores han propuesto la aplicación de distintas técnicas metabolómicas para el estudio de la EA, tanto en humanos como en animales modelo.

La aplicación de técnicas de neuroimagen basadas en espectroscopía de resonancia magnética (MRS) para la caracterización *in vivo* de los perfiles neuroquímicos puede considerarse como la primera aproximación metabolómica a la EA. Esta herramienta ha sido satisfactoriamente empleada en la investigación de la EA y su progresión desde el deterioro cognitivo leve [141, 142], así como en el estudio de numerosos ratones modelo de esta enfermedad [66, 143, 144]. Así, algunos de los hallazgos más notables identificados mediante MRS *in vivo* son la disminución de los niveles de glutamato y glutamina, la reducción de N-acetil aspartato, un marcador de integridad neuronal, o el aumento de mio-inositol, indicativo de estrés osmótico o astrogliosis, entre otros. Sin embargo, el limitado número de metabolitos analizables mediante MRS, principalmente debido a su baja sensibilidad, hacen que esta técnica no tenga una gran aplicabilidad en metabolómica.

Desde la publicación de los primeros estudios metabolómicos de la enfermedad de Alzheimer en el año 2008, numerosas plataformas analíticas se han empleado para caracterizar las anomalías metabólicas asociadas a esta enfermedad, incluyendo RMN, técnicas basadas en MS y métodos electroquímicos. El análisis de tejido cerebral presenta un gran potencial ya que permite estudiar de forma directa los procesos patológicos propios de la EA, aunque su disponibilidad es limitada. Alternativamente, el LCR es un fluido biológico de gran interés ya que su composición refleja directamente la producción metabólica cerebral. Por último, el estudio de muestras no

invasivas como suero y plasma sanguíneo, o en menor medida orina y saliva, también ha sido propuesto con el objetivo de identificar posibles biomarcadores de diagnóstico de utilidad clínica.

2.4.1. ESTUDIOS METABOLÓMICOS EN PACIENTES DE ALZHEIMER

❖ TEJIDO CEREBRAL

El empleo de muestras de tejido cerebral *post-mortem* permite investigar la neuropatología característica de la EA de forma directa, pero su disponibilidad es muy limitada. Además, el uso de tejido *post-mortem* implica que la enfermedad está en su estadio final, lo que imposibilita el estudio de la patogénesis de la enfermedad en etapas tempranas. Por todo ello, sólo existen algunos trabajos metabolómicos preliminares en cerebro de pacientes con EA, los cuales han demostrado un gran potencial pero requieren de futuros estudios de validación con un tamaño poblacional mayor y mejor caracterizado (Tabla 2). Botosoa *et al.* investigaron comparativamente las diferencias metabolómicas en corteza cerebral frontal en dos enfermedades neurodegenerativas, la EA y la esclerosis lateral amiotrófica, encontrando alteraciones significativas en algunos metabolitos de bajo peso molecular (alanina, acetato, glutamato, glutamina, lactato, creatina) [145]. En otro estudio, la combinación de técnicas metabolómicas y dirigidas reveló la implicación de la ruta de las poliaminas en la patología de la EA [146]. Por último, Graham *et al.* han demostrado la utilidad de distintas plataformas metabolómicas, como ¹H-RMN y UHPLC-MS, para el análisis del metaboloma polar cerebral, con un gran potencial para la discriminación entre pacientes de EA y sujetos controles [147, 148].

❖ LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Múltiples plataformas analíticas se han propuesto para caracterizar las anormalidades metabólicas presentes en LCR, un fluido de gran interés en el estudio de enfermedades neuronales ya que se encuentra en estrecha proximidad a la patología cerebral (Tabla 2). La espectroscopía de RMN ha demostrado ser capaz de diferenciar entre pacientes de EA y controles sanos, pero su baja sensibilidad limita en gran medida el número de metabolitos detectables [149, 150]. Alternativamente, las técnicas basadas en cromatografía líquida han sido extensamente empleadas gracias a su amplio

rango de aplicabilidad. Así, con el fin de obtener una amplia cobertura metabólica se han propuesto distintos métodos basados en MS mediante el empleo de mecanismos de separación complementarios, como RP-LC-MS y HILIC-MS [151, 152]. Por el contrario, Kaddurah-Daouk *et al.* demostraron la utilidad de la detección electroquímica coulombimétrica (ECA, *electrochemical coulometric array detection*) para el análisis de metabolitos implicados en distintas rutas de neurotransmisión [153-155]. Además, el uso combinado de GC/LC-MS se ha propuesto como una plataforma idónea para la caracterización global de metabolitos de distinta naturaleza química, cuya aplicación a LCR de pacientes con EA y sujetos sanos reveló cambios significativos en los niveles de cortisol, cisteína y uridina [156]. Por último, el acoplamiento CE-MS también ha demostrado un gran potencial para el análisis del metaboloma polar en LCR y el estudio de la progresión de la EA [157].

❖ MUESTRAS NO INVASIVAS: SUERO/PLASMA, ORINA, SALIVA

A pesar de que las alteraciones detectadas en LCR reflejan más fidedignamente los cambios neuropatológicos propios de la EA, el uso de muestras sanguíneas presenta un gran potencial para el desarrollo de métodos de diagnóstico no invasivos, baratos y más simples. Al igual que en el análisis de LCR, la plataforma analítica más empleada para caracterizar los perfiles metabólicos en suero y plasma es el acoplamiento LC-MS, en solitario [158-160] o combinado con GC-MS para expandir la cobertura metabólica [161, 162]. Sin embargo, cabe destacar que el análisis integral de distintos fluidos biológicos se ha propuesto como una alternativa para realizar una investigación más exhaustiva de los mecanismos patológicos asociados a la EA. En este sentido, Trushina *et al.* identificaron numerosas rutas metabólicas alteradas en EA y DCL mediante el análisis de plasma y LCR con RP/HILIC-UHPLC-MS [163]. Alternativamente, trabajos más recientes han considerado el análisis combinado de suero sanguíneo y otros fluidos como orina [164] o saliva [165], demostrando el potencial de estas muestras no invasivas para el estudio de la EA.

Tabla 2. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabolómicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos.

plataforma analítica	muestra	resultados	Ref.
¹ H-RMN	corteza frontal	↑alanina, acetato, glutamato, glutamina; ↓lactato, creatina	[145]
UHPLC-MS	cerebro	↑espermina, espermidina	[146]
UHPLC-MS	cerebro	76 iones discriminantes (no identificados)	[147]
¹ H-RMN	cerebro	↑alanina, taurina	[148]
¹ H-RMN	LCR	resonancias específicas en EA (no identificadas)	[149]
¹ H-RMN	LCR	↑creatinina	[150]
UHPLC-MS	LCR	cambios progresivos (control-DCL-EA) en los niveles de: uracilo, xantina, uridina, tirosina, metil-salsolinol, nonanoilglicina, dopamina-quinona, ácido caproico, vanilglicol, histidina, ácido pipercolico, hidroxifosfomil-piruvato, creatinina, taurina, C16-esfingosina-1-fosfato, triptófano, 5'-metiltioadenosina	[151]
nLC-MS	LCR	53 iones discriminantes (no identificados)	[152]
LC-ECA	LCR	metabolitos implicados en las rutas de la tirosina, triptófano, purina y tocoferol	[153]
LC-ECA	LCR	↑metionina, ácido 5-hidroxi-indolacético, ácido vanilmandélico, xantósina, glutatión (EA); ↑ metionina, ácido 5-hidroxi-indolacético, hipoxantina (DCL)	[154]
LC-ECA	LCR	2 metabolitos discriminantes (no identificados)	[155]
LC/GC-MS	LCR	↑cortisol, cisteína; ↓uridina	[156]

Tabla 2. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabolómicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos (continuación).

plataforma analítica	muestra	resultados	Ref.
CE-MS	LCR	cambios progresivos (control-DCL-EA) en los niveles de: colina, dimetil-arginina, arginina, valina, prolina, serina, histidina, creatina, carnitina, suberil-glicina	[157]
UHPLC-MS	plasma	↑ácidos biliares	[158]
UHPLC-MS	plasma	↓liso-fosfolinas, derivados de esfingosina, triptófano	[159]
UHPLC-MS	plasma	↓esfingomielinas	[160]
UHPLC-MS GC×GC-MS	suero	↓plasmalógenos, fosfolinas, esfingomielinas, esteroides; ↑2,4-dihidroxitirato, PC(16:0/16:0) (marcadores de progresión)	[161]
UHPLC-MS GC-MS	plasma	marcadores de EA: ácido araquidónico, dimetil-glicina, timina, glutamina, glutamato, citidina marcadores de DCL: timina, ácido araquidónico, ácido 2-aminoadípico, dimetil-glicina, ácido 5,8-tetradecadienoico	[162]
UHPLC-MS	plasma, LCR	cambios en más de 150 metabolitos en LCR y plasma (aminoácidos, metabolismo energético, lípidos, neurotransmisores)	[163]
UHPLC-MS	suero, orina	57/54 metabolitos discriminantes en suero/orina (aminoácidos, ácidos grasos, amidas de ácidos grasos)	[164]
CE-MS	suero, saliva	marcadores en suero: β-alanina, creatinina, hidroxiprolina, glutamina, isocitrato, citidina marcadores en saliva: arginina, tirosina	[165]

2.4.2. ESTUDIOS METABOLÓMICOS EN RATONES MODELO

La aplicación de técnicas metabolómicas en modelos animales ha demostrado en los últimos años un gran potencial para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, principalmente mediante el uso de ratones transgénicos (Tabla 3). Una de las grandes ventajas de emplear ratones modelo es la posibilidad de obtener muestras de tejido cerebral en distintas etapas de la enfermedad, lo cual es inviable en estudios con humanos. En este sentido, Forster *et al.* analizaron extractos cerebrales de la línea transgénica TASTPM para investigar la progresión de las alteraciones metabólicas con la edad, encontrando diferencias significativas en las concentraciones de metabolitos como el mio-inositol, glicerofosfocolina, succinato y colina [166]. En otro estudio, la inactivación de la monoacil-glicerol lipasa en el ratón transgénico APP/PS1 permitió demostrar la implicación de un metabolismo anormal de los endocannabinoides y eicosanoides en la patogénesis de la EA [167]. Alternativamente, otros autores han propuesto el estudio de áreas cerebrales individuales, como hipocampo [168-170], corteza cerebral [171] o cerebelo [172, 173], así como estudios comparativos de distintas regiones cerebrales [174-176] para investigar la especificidad regional de los mecanismos neuropatológicos característicos de la EA. Estos estudios han demostrado que el hipocampo y la corteza cerebral son las regiones más afectadas por la EA, pero también se producen perturbaciones metabólicas en otras áreas como el cerebelo o el mesencéfalo.

Debido a la fácil disponibilidad de muestras de tejido cerebral, el empleo de fluidos biológicos no es tan común en estos estudios metabolómicos con ratones modelo. En este contexto, Graham *et al.* analizaron comparativamente muestras de cerebro y plasma de ratones APP/PS1 con el objetivo de descubrir nuevos biomarcadores de la EA [177]. Aunque el número de metabolitos detectados en plasma fue inferior, los modelos estadísticos usando los perfiles de este fluido permitieron una mejor clasificación, demostrando el potencial de las muestras no invasivas para el estudio de las alteraciones patológicas subyacentes a este desorden neurodegenerativo. De forma similar, el análisis metabolómico de plasma y cerebro del ratón TASTPM también reveló alteraciones en distintos metabolitos en ambas matrices, que podrían relacionarse con perturbaciones previamente descritas en pacientes afectados por la EA [178]. Jiang *et al.* encontraron diferencias significativas en suero del ratón SAMP8, las cuales podrían indicar un metabolismo anormal de la

glucosa y los lípidos, así como una función protectora atenuada de la inosina [179]. Por último, la metabolómica también se ha aplicado para examinar cambios metabólicos en orina, demostrando la utilidad de esta muestra de fácil disponibilidad clínica para la búsqueda de potenciales biomarcadores [180, 181].

2.4.3. LA LIPIDÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los lípidos constituyen la clase más extensa y abundante del metaboloma de cualquier sistema biológico, el cual está formado a su vez por múltiples familias de compuestos como fosfolípidos, esfingolípidos, glicerolípidos y esteroides, entre otros. Debido a la elevada heterogeneidad de estos compuestos, el análisis integral del conjunto de todos los lípidos es imposible mediante el empleo de los métodos metabolómicos convencionales. Esto ha conducido al desarrollo de nuevas técnicas dirigidas al análisis del metaboloma lipofílico, o lipidómica, las cuales han demostrado una gran utilidad en el estudio de la EA ya que los lípidos participan en múltiples procesos esenciales en el SNC (*e.g.* mantenimiento de membranas neuronales, formación de balsas lipídicas, rutas de señalización).

Una de las plataformas lipidómicas más aplicadas al estudio de la EA es la denominada MDMS-SL (*multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics*), basada en la extracción fraccional de las distintas clases de lípidos según sus características físico-químicas y posterior análisis mediante DI-ESI-MS [182]. Mediante este enfoque lipidómico, Han *et al.* encontraron una disminución significativa de los niveles de sulfatidas en diferentes regiones cerebrales de pacientes afectados por EA, acompañado por un aumento de ceramidas [183]. Posteriormente, se ha demostrado que esta disminución en el contenido cerebral de sulfatidas puede relacionarse con una alteración en la homeostasis mediada por la apolipoproteína E [184], lo cual también se ha observado en distintos estudios con ratones transgénicos [185]. Más recientemente, la aplicación de MDMS-SL también ha permitido relacionar la patogénesis de la EA con la disminución de los niveles de esfingomielinas de cadena larga y el aumento de las correspondientes ceramidas, lo que sugiere una hidrólisis acelerada de estos esfingolípidos [186].

Tabla 3. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabolómicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en ratones modelo.

plataforma analítica	modelo	muestra	resultados	Ref.
¹ H-RMN	TASTPM	cerebro	↑mio-inositol, colina, glicerofosfolina; ↓succinato	[166]
LC-MS	APP/PS1, APP/PS1/Mg ^{-/-}	cerebro	↑monoglicéridos, N-acil-etanolaminas, ácidos grasos libres, eicosanoides, ácidos fosfatídicos, lisofosfolinas, ésteres de colesterol (APP/PS1); ↑2-araquidonoil-glicerol, ↓ácido araquidónico, prostaglandinas, tromboxano B2 (Mg ^{-/-})	[167]
GC-MS	APP, PS1, APP/PS1	hipocampo	metabolismo energético alterado y disfunción mitocondrial	[168]
DI-MS	CRND8	hipocampo	producción de eicosanoides, fallos en β-oxidación de ácidos grasos y metabolismo alterado de la glucosa	[169]
GC-MS	SAMP8	hipocampo	↑colesterol, ácido oleico, fosfoglicérido, N-acetil-aspartato ↓alanina, serina, glicina, aspartato, glutamato, ácido γ-aminobutírico, malato, ácido butanodioico, fumarato, citrato, piroglutamato, urea, lactato	[170]
¹ H-RMN	Tg2576	corteza cerebral	↓N-acetil-aspartato, glutamato, glutatión; ↑taurina	[171]
¹ H-RMN	Tg2576	cerebelo	↑taurina, creatina, glutamato, N-acetil-aspartato, ácido γ-aminobutírico	[172]
DI-MS	CRND8	cerebelo	producción de eicosanoides, fallos en el metabolismo de la purina y biosíntesis de aminoácidos	[173]

Tabla 3. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabólicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en ratones modelo (continuación).

plataforma analítica	modelo	muestra	resultados	Ref.
¹ H-RMN	CRND8	corteza, corteza frontal, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatorio, puente de Varolio, mesencéfalo, estriado	↓N-acetil-aspartato, glutamato, glutamina, taurina, ácido γ-aminobutírico, colina, fosfocolina, creatina, fosfocreatina, succinato; ↑lactato, aspartato, glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, ácidos grasos libres	[174]
¹ H-RMN	APP/PS1	corteza (frontal, occipital, parietal y temporal), hipocampo, tálamo	↓N-acetil-aspartato; ↑mio-inositol, escilo-inositol	[175]
¹ H-RMN	Tg2576	corteza (frontal y rinal), hipocampo, mesencéfalo, cerebelo	↓glutamato, N-acetil-aspartato, mio-inositol, fosfocolina, ácido γ-aminobutírico; ↑creatina, taurina	[176]
¹ H-RMN	APP/PS1	cerebro, plasma	cerebro: ↓N-acetil-aspartato, ácido γ-aminobutírico, creatina, ácido ascórbico plasma: ↓glutamato, glutamina, metionina, acetato, citrato	[177]
GC-MS	TASTPM	cerebro, plasma	cerebro: ↑fructosa, valina, serina, treonina, ↓zimosterol plasma: ↓ glucosa, galactosa, ácido; linoleico, ácido araquidónico, ácido palmítico, ácido gluconico	[178]

Tabla 3. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metabólicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en ratones modelo (continuación).

plataforma analítica	modelo	muestra	resultados	Ref.
¹ H-RMN	SAMP8	suero	↓inosina, glucosa, ácidos grasos poli-insaturados, colina, fosfocolina, HDL, LDL, 3-hidroxi-butilato, citrato, piruvato ↑lactato, ácidos grasos saturados, alanina, metionina, glutamina, VLDL	[179]
¹ H-RMN	Tg2576	orina	↑3-hidroxiquinurenina, homogentisato, alantoína	[180]
LC-MS	CRND8	orina	↑metionina, desaminotirosina; ↓colina, taurina, N1-acetil-espermidina, ácido 5-hidroxi-indoleacético	[181]

Las anomalías en el metabolismo de fosfolípidos de membrana también han demostrado jugar un papel muy prominente en la patogénesis de la EA. Así, numerosos autores han propuesto el uso de técnicas basadas en LC-MS para la caracterización del fosfolipidoma típico de la EA en distintas muestras biológicas, incluyendo tejido cerebral [187], LCR [188] y plasma sanguíneo [189]. Por norma general, la sobre-activación de las fosfolipasas en la EA provoca la disminución del contenido total de fosfolípidos y la acumulación de sus productos de degradación, pero se ha demostrado que en este proceso de ruptura de membranas neuronales intervienen otros factores como la composición de los ácidos grasos contenidos en su estructura [190]. Alternativamente, la implicación del metabolismo del colesterol en la EA también se ha investigado mediante el análisis semi-dirigido de esteroides y compuestos relacionados en cerebro [191, 192] y plasma [193], lo que ha permitido identificar potenciales biomarcadores de diagnóstico, como los oxisteroles o el demosterol.

Muchos de estos hallazgos también se han descrito en ratones modelo, confirmando la importancia del metabolismo lipídico en la patogénesis de la EA. En este sentido, Chan *et al.* analizaron comparativamente tejido cerebral de pacientes y ratones transgénicos de EA, encontrando en ambos un aumento significativo de ésteres de colesterol y gangliósido GM3, lo cual podría ser indicativo de disfunción endolisosomal [194]. En otro estudio, el análisis integral de muestras de plasma y cerebro permitió caracterizar de forma global los fallos lipídicos en una línea transgénica doble APP/tau, demostrando la implicación de numerosas clases de lípidos [195]. Además, otros autores han evidenciado la perturbación de numerosos lípidos de membrana en cerebro del ratón APP/PS1, en analogía con los resultados observados en estudios con humanos, incluyendo un menor contenido total de colesterol, fosfolípidos y sulfatidas, y un aumento de ácidos grasos saturados [196, 197].

3. LA METALÓMICA: IMPORTANCIA DE LOS METÁLES EN LOS PROCESOS BIOLÓGICOS

3.1. INTRODUCCIÓN A LA METALÓMICA

Los elementos metálicos y metaloides son componentes esenciales de los sistemas biológicos, los cuales regulan e intervienen en numerosos procesos celulares, como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Función biológica de los elementos metálicos y metaloides más abundantes.

	elemento	función biológica
elementos mayoritarios	Ca	señalización intracelular, factor de coagulación, formación de huesos
elementos minoritarios	K	electrolito
	Na	electrolito
	Mg	cofactor de enzimas (glicolisis)
elementos traza	Fe	cofactor de enzimas (transporte y almacenamiento de oxígeno)
	Zn	cofactor de enzimas (polimerasas, anhidrasa carbónica)
	Mn	cofactor de enzimas (superóxido dismutasa, piruvato quinasa)
	Cu	cofactor de enzimas (transporte de oxígeno, transferencia de electrones)
	Pb	tóxico
	elementos ultratrazas	Al
Cd		tóxico
Hg		tóxico
Se		antioxidante (glutación peroxidasa)
Mo		cofactor de enzimas (xantina oxidasa, nitrato reductasa)
Ni		cofactor de enzimas (ureasa)
Cr		factor de tolerancia a la glucosa, metabolismo de lípidos y proteínas
As		tóxico
Co		cofactor (vitamina B12)
V		metabolismo del colesterol

Algunos metales actúan como electrolitos celulares (*e.g.* sodio, potasio), pero una de las funciones más importantes de estos elementos es su participación como cofactores proteicos (*e.g.* hierro, zinc, cobre, molibdeno). Además, algunos metales y metaloides también forman parte de numerosos metabolitos (*e.g.* arsenicales, seleno-compuestos, complejos de coordinación) y otros metalo-compuestos exógenos (*e.g.* fármacos).

El estudio del conjunto de todas las especies metálicas en un sistema biológico es de vital importancia para comprender la compleja homeostasis de estos elementos y su repercusión en la expresión fenotípica final. Así, en analogía con la terminología empleada en las ciencias ómicas convencionales, Williams acuñó el término metaloma en el año 2001 para referirse a la distribución elemental de los distintos metales en una célula, compartimento celular u organismo [198], cuyo análisis integral recibe el nombre de metalómica [199]. Sin embargo, los metales y metaloides no pueden considerarse como componentes biológicos independientes a los niveles de organización básicos establecidos por el dogma central de la biología, sino que su función está directamente interrelacionada con la expresión genómica, proteómica y metabolómica (Figura 14). Por ello, actualmente la IUPAC define la metalómica como “el estudio del metaloma y de las interacciones y conexiones funcionales de las especies metálicas con los genes, proteínas, metabolitos y otras biomoléculas en los sistemas biológicos” [200].

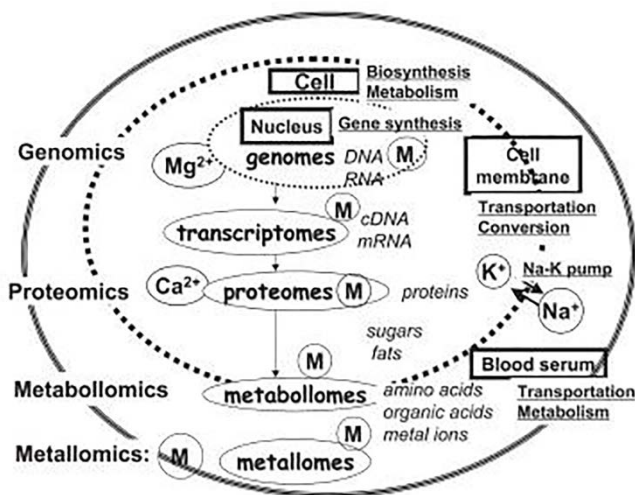


Figura 14. Modelo simplificado de un sistema biológico, donde se muestran las interacciones entre el genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma y metaloma [199].

A diferencia del resto de ciencias ómicas, el campo de estudio de la metalómica presenta una elevada heterogeneidad química y funcional debido a la gran diversidad de metaloespecies existentes [201], como se observa en la Figura 15. Entre estas especies metálicas destacan las metaloproteínas, las cuales pueden contener un heteroelemento enlazado covalentemente (*e.g.* selenoproteínas) o un centro metálico unido por coordinación. El segundo gran grupo de metaloespecies son los metalometabolitos, entre los que se incluyen complejos metálicos con ligandos orgánicos (*e.g.* aminoácidos, ácidos orgánicos), metabolitos con un elemento metaloide covalentemente incorporado (*e.g.* As, Se) y otros compuestos exógenos como metalofármacos. En este contexto, han surgido distintas sub-disciplinas dentro del marco de la metalómica, entre las que se pueden destacar la metaloproteómica, metalometabolómica y la ionómica, esta última basada en la determinación del contenido multielemental de una muestra biológica sin tener en cuenta las distintas especies químicas.

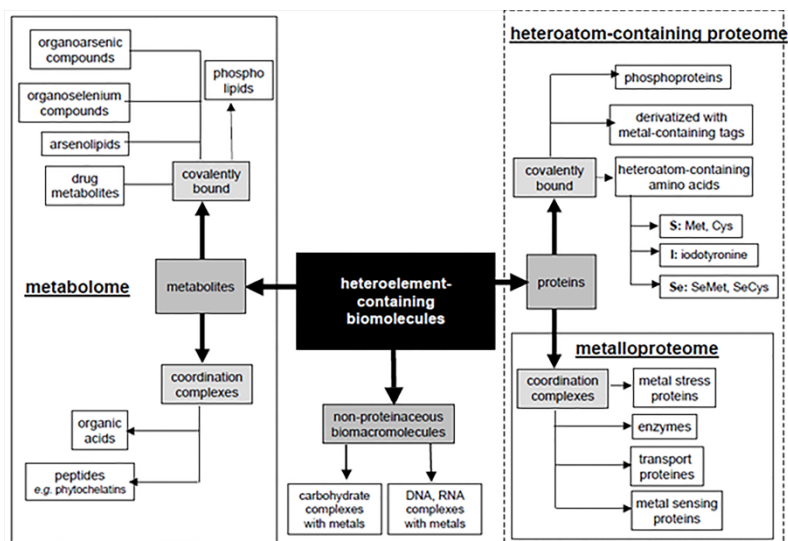


Figura 15. Diferentes clases de metaloespecies englobadas en el metaloma [202].

Por todo ello, teniendo en cuenta la multiplicidad de metalo-moléculas existentes, y la relevancia de las mismas en los sistemas químicos y biológicos, la metalómica se ha convertido en un área de investigación multidisciplinar con un gran potencial en numerosas campos, como la biología clínica, química medioambiental, geoquímica, nutrición y farmacología, entre otros [201].

3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN METALÓMICA

Las plataformas metalómicas normalmente constan de tres unidades analíticas, como se esquematiza en la Figura 16 [202].

- **Técnicas de separación:** electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar.
- **Detección atómica:** espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, *inductively-coupled plasma mass spectrometry*), espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES, *inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy*), fluorescencia de rayos X (XRF, *X-ray fluorescence*), espectroscopía de absorción de rayos X (XAS, *X-ray absorption spectroscopy*), análisis por activación de neutrones (NAA, *neutron activation analysis*). Permiten detectar de forma específica las biomoléculas que contienen un heteroelemento en su estructura.
- **Detección molecular:** espectrometría de masas con fuente de electrospray (ESI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*). Permiten llevar a cabo la identificación estructural de las biomoléculas que contienen un heteroelemento en su estructura.

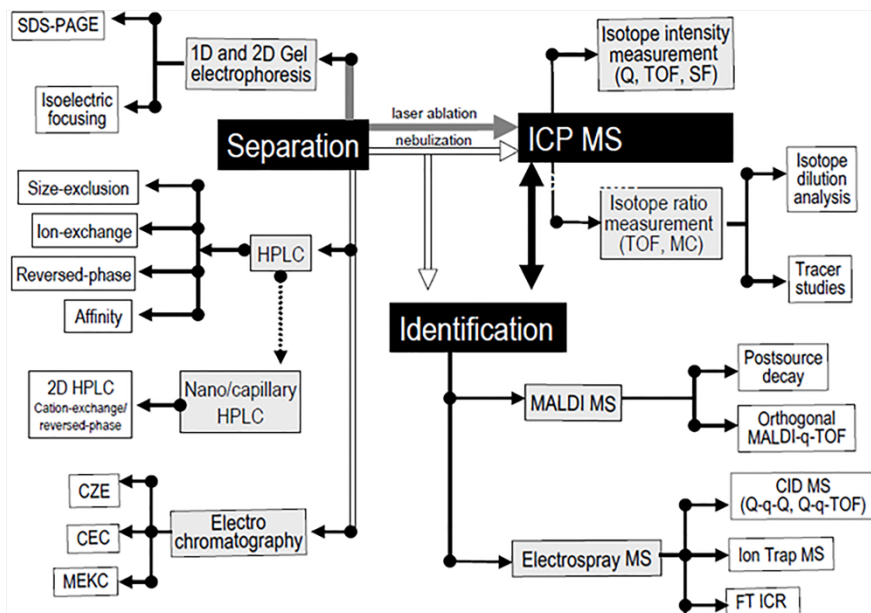


Figura 16. Técnicas analíticas empleadas en metalómica [202].

Las condiciones óptimas de extracción de muestra y posterior separación cromatográfica o electroforética dependerán de los objetivos específicos de cada experimento metalómico (metalo-proteómica, metalo-metabolómica, determinación del contenido total de metales). Sin embargo, un factor clave a tener en cuenta en cualquier diseño experimental metalómico es asegurar la estabilidad termodinámica de las metaloespecies, debido a la labilidad que suelen mostrar los enlaces metal-biomolécula (excepto en especies unidas covalentemente).

Posteriormente, el acoplamiento instrumental con las distintas técnicas de detección puede realizarse mediante nebulización, para plataformas basadas en separación en columna o capilar, o mediante ablación láser en el caso de separaciones bidimensionales.

3.2.1. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN EN METALÓMICA

Las técnicas de separación empleadas en metalo-metabolómica son análogas a las ya descritas para estudios metabolómicos convencionales (*e.g.* RP-LC, HILIC, CE, ver sección 2.3.2), con la dificultad añadida de la posible transformación de metaloespecies durante el proceso de separación y la ruptura de los enlaces metal-biomolécula.

Alternativamente, la separación de especies en (metalo)-proteómica suele realizarse mediante el empleo de procedimientos multidimensionales, ya que ninguna técnica individual permite resolver el conjunto de todas las proteínas. Estas plataformas multidimensionales emplean dos (o más) métodos de separación ortogonales con mecanismos de retención complementarios (electroforesis en gel 2D, LC×LC, LC×CE, CE×CE), lo cual permite expandir la cobertura analítica [203]. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) es la técnica más ampliamente utilizada para llevar a cabo la separación de proteomas complejos, habitualmente en su modalidad bidimensional mediante el acoplamiento de isoelectroenfoque (IEF, *isoelectric focusing*) y PAGE. Sin embargo, su uso se ve dificultado en metalómica ya que los complejos metálicos pueden disociar fácilmente durante el proceso de migración y tinción de geles, por lo que deben tomarse grandes precauciones para realizar la separación en condiciones no desnaturalizantes, y evitar la presencia de impurezas metálicas en los geles y los reactivos de tinción. Las técnicas basadas en cromatografía líquida

también presentan un gran potencial en (metalo)-proteómica gracias a su amplio rango de aplicabilidad debido a la disponibilidad de distintas fases estacionarias. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, *size exclusion chromatography*) es una de las modalidades más empleadas para conseguir un pre-fraccionamiento del proteoma según la masa molecular, eliminando al mismo tiempo compuestos de bajo peso como sales y otros metabolitos. Sin embargo, la resolución cromatográfica es muy baja, por lo que normalmente se requiere de una segunda dimensión para separar proteínas de tamaño similar en función de otra propiedad físico-química como la polaridad (RP-LC), carga eléctrica (IEX-LC, *ion exchange liquid chromatography*) o afinidad. Por último, la electroforesis capilar también ha demostrado una gran utilidad gracias a su elevada resolución y el desarrollo de múltiples modos de electromigración complementarios (CZE, MEKC, IEF), aunque su aplicabilidad se ve limitada a péptidos y proteínas de bajo peso molecular. De este modo puede concluirse que la complementariedad de las distintas técnicas de separación posibilita en gran medida el análisis integral del (metalo)-proteoma, entre las cuales destacan la SEC y PAGE por su capacidad de separar biomoléculas de gran tamaño, así como las técnicas electroforéticas por su elevado poder de resolución (Figura 17) [204].

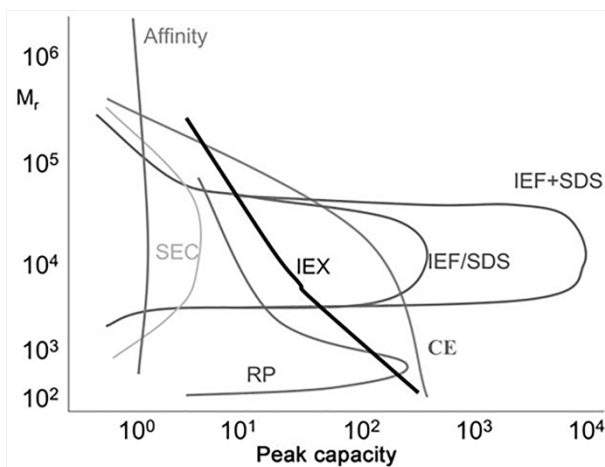


Figura 17. Complementariedad de las técnicas de separación empleadas en (metalo)-proteómica [204].

Aunque estas plataformas analíticas basadas en técnicas de separación son los procedimientos más ampliamente utilizados en metalómica, presentan una serie de limitaciones como el elevado tiempo de análisis y problemas

asociados a la transformación de metaloespecies y la pérdida de metales durante la separación. Por ello, se han propuesto otros métodos alternativos para llevar a cabo el fraccionamiento de biomoléculas según su peso molecular, como la ultracentrifugación, ultrafiltración o precipitación de proteínas en condiciones no desnaturalizantes [205, 206].

3.2.2. DETECCIÓN ESPECÍFICA DE HETEROELEMENTOS: EL ICP-MS

Una de los grandes potenciales de la metalómica es la posibilidad de detectar las metalo-biomoléculas de forma específica mediante el empleo de técnicas atómicas gracias a la presencia de heteroelementos (*i.e.* metales o metaloides) en su estructura. En la actualidad, la herramienta más extendida es el ICP-MS, el cual ha reemplazado a otras técnicas nucleares tradicionales como XRF, XAS y NAA [207].

En el ICP-MS la fuente de ionización es un plasma, normalmente de argón, generado mediante la aplicación de un intenso campo electromagnético. Las altas temperaturas alcanzadas en este plasma (7000 K) provocan la ionización y atomización de los analitos, que posteriormente son detectados en MS generando un espectro elemental simple. Las principales ventajas de esta técnica son su capacidad de detección multielemental y elevada sensibilidad, la cual es independiente del ambiente de coordinación del heteroelemento y de la matriz [202]. Sin embargo, el análisis por ICP-MS sufre de numerosas interferencias isotópicas, lo que hace necesario el empleo de sistemas de alta resolución o celdas de colisión/reacción para eliminar interferencias poliatómicas. Además, su acoplamiento a sistemas de separación se ve dificultado cuando se emplean fases móviles orgánicas (*e.g.* RP-LC), debido a la deposición de carbón en conos y lentes que genera inestabilidad del plasma, lo cual puede conducir a su extinción.

En cualquier caso, el empleo del ICP-MS como detector elemental selectivo es una de las aproximaciones metalómicas más extendidas actualmente, ya que permite llevar a cabo la detección simultánea de múltiples metalo-biomoléculas de forma cuantitativa.

3.2.3. IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE METALO-BIOMOLÉCULAS: LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MOLECULAR

Tras la detección y cuantificación de las metalo-biomoléculas mediante técnicas atómicas como el ICP-MS, es necesaria la aplicación de herramientas moleculares basadas en MS para llevar a cabo la elucidación estructural de las distintas especies. El estudio de metalo-metabolitos puede abordarse mediante el empleo de múltiples técnicas de ionización complementarias, como APCI, APPI y, sobre todo, ESI (ver sección 2.3.2). Por el contrario, la secuenciación de (metalo)-proteínas es más compleja ya que normalmente requiere de una etapa de digestión trípica para obtener un perfil peptídico que permita la posterior identificación de la proteína mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. En particular, las plataformas ESI-MS y MALDI-MS presentan un gran potencial para llevar a cabo la determinación estructural de metaloproteínas, ya que estas técnicas de ionización permiten conservar el enlace metal-biomolécula. La ionización por electrospray puede emplearse para realizar la detección on-line de proteínas mediante la formación de iones multicargados, pero la fuente de ionización convencional para este tipo de biomoléculas es el MALDI. La ionización MALDI se basa en la co-precipitación de la muestra en una matriz capaz de absorber luz ultravioleta. Posteriormente, la mezcla se irradia con un láser, y la energía electromagnética es absorbida por la matriz y utilizada para llevar a cabo la desorción e ionización de los analitos. Al ser una técnica de ionización suave, el MALDI es idóneo para la ionización de proteínas sin inducir su fragmentación. Además, la disponibilidad de múltiples matrices (*e.g.* ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, ácido sinapínico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico) permite analizar un amplio rango de macromoléculas de diversas propiedades físico-químicas.

3.3. APLICACIÓN DE TÉCNICAS METALÓMICAS EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con alteraciones en el metabolismo de múltiples elementos metálicos, como se ha descrito anteriormente en la sección 1.2.7. Así, numerosos autores han propuesto la aplicación de técnicas de análisis multielemental (iónica) para investigar

los procesos patológicos asociados a estas perturbaciones en la homeostasis de elementos tanto esenciales como tóxicos (Tabla 5).

Las anormalidades en el metabolismo del hierro, zinc y cobre son una de las señas de identidad de la metalo-biología asociada a la EA, ya que participan en las proteopatías características de esta enfermedad y en la producción de estrés oxidativo. Así, numerosos estudios han demostrado la acumulación de estos metales en distintas regiones cerebrales de pacientes afectados por EA, principalmente alrededor de los depósitos amiloideos [34, 208, 209]. Por el contrario, en fluidos biológicos como LCR y suero/plasma sanguíneo, los niveles de hierro y zinc suelen encontrarse disminuidos en EA [210-217], mientras que los niveles de cobre tienden a aumentar a lo largo de la progresión de la enfermedad [211, 212, 218, 219]. Estas alteraciones se han asociado a fallos en los mecanismos homeostáticos de transporte y almacenamiento de estos metales en el organismo [220], así como con un flujo anormal a través de la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo [221], causando su acumulación en el cerebro.

El manganeso también se ha relacionado estrechamente con distintas enfermedades neurodegenerativas, principalmente la enfermedad de Parkinson, ya que puede promover mecanismos neurotóxicos como estrés oxidativo, disrupción mitocondrial o metabolismo alterado del glutamato y la dopamina [222]. Sin embargo, los estudios publicados sobre niveles de este metal en cerebro, LCR y sangre en pacientes con EA son muy confusos. Andrási *et al.* encontraron que los niveles cerebrales de manganeso variaban según la región considerada [223], mientras que otro estudio más reciente reveló un aumento de este metal en la corteza parietal [224]. Además, esta variabilidad de resultados es aún más notable en análisis de fluidos como LCR [225] y sangre [211, 212, 225-228]. En cualquier caso, existen evidencias de la implicación del manganeso en la patogénesis de esta enfermedad, ya que la actividad de algunas de las enzimas que emplean este metal como cofactor se ha encontrado reducida en pacientes de EA, como la superóxido dismutasa mitocondrial de Mn [229] y la arginasa [230].

Además de estos cuatro elementos de transición mayoritarios, otros oligoelementos esenciales podrían estar implicados en el desarrollo de la EA, entre los que destacan el vanadio [225], cromo [210, 218], molibdeno [212, 226] y cobalto [210, 212, 213, 218, 226]. Estos metales participan en múltiples procesos biológicos vitales, regulando el metabolismo de la glucosa

(V, Cr), de las purinas (Mo) y la biosíntesis de vitamina B12 (Co). Sin embargo, a día de hoy aún se desconoce cuál puede ser el papel exacto de estos elementos en la patogénesis de la EA.

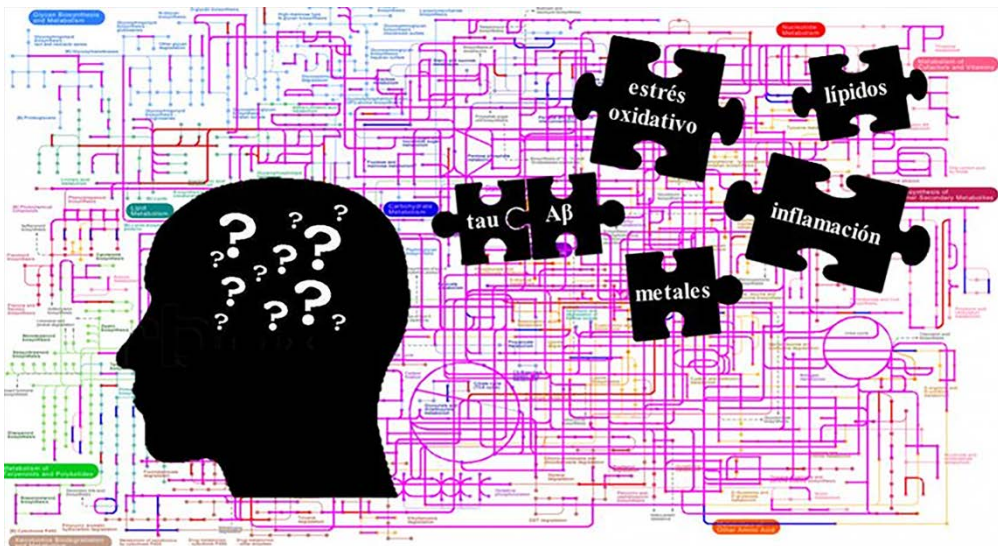
Numerosos autores también han demostrado que existe una correlación negativa entre el deterioro cognitivo y los niveles de selenio y la actividad de distintas selenoproteínas en pacientes afectados por EA [44]. Así, aunque los resultados obtenidos del análisis de este metaloide en tejido cerebral no son concluyentes [208, 231-233], los niveles de selenio total en suero y plasma sanguíneo suelen encontrarse disminuidos [214, 218, 234, 235], lo cual puede ser indicativo de una respuesta protectora frente al estrés oxidativo.

Por último cabe destacar que la exposición a distintos elementos tóxicos, como el aluminio, mercurio, plomo, cadmio o arsénico, los cuales no poseen ninguna función biológica conocida, se ha propuesto como un factor de riesgo de la EA. En particular, estos elementos son especialmente perjudiciales para el cerebro ya que, a diferencia de otros metales funcionales, su homeostasis no está tan estrechamente regulada. Los efectos neurotóxicos más importantes del aluminio y el plomo son su capacidad de desencadenar la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, provocar fallos en la neurotransmisión y la inducción de estrés oxidativo [43, 236]. Alternativamente, se ha demostrado que la exposición a mercurio y arsénico induce la aparición de rasgos patológicos propios de la EA [237, 238]. Además, tanto el plomo como el cadmio provocan la disminución del contenido cerebral de acetilcolina [239, 240], un neurotransmisor comúnmente asociado a la EA. En este contexto, numerosos estudios han relacionado la aparición de la EA con un incremento en el contenido total de aluminio en cerebro [42, 209] y sangre [211, 218, 228, 241]. Del mismo modo, los niveles de mercurio también se han encontrado incrementados en pacientes de EA en ambas muestras biológicas [208, 211, 212, 225, 226, 242]. Por el contrario, sólo algunos autores han informado de cambios significativos en los niveles de cadmio [211, 212], plomo [225, 235] y arsénico [217, 228], por lo que su implicación en la patogénesis de la EA es más dudosa.

Tabla 5. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de técnicas metalómicas para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.

elemento	resultados	Ref.
Fe	↑cerebro	[34], [208], [209]
	↓LCR	[210]
	↓suero/plasma	[211], [212], [213], [214]
Zn	↑cerebro	[34], [208], [209]
	↓LCR	[215], [216]
	↓ suero/plasma	[212], [213], [214], [217]
Cu	↑cerebro	[34], [209]
	↑LCR	[211]
	↑suero/plasma	[212], [218], [219]
Mn	↑↓cerebro	[223], [224]
	↓LCR	[225]
	↑↓suero/plasma	↑[212], [225], [226], [227]; ↓[211], [228]
V	↓LCR	[225]
Cr	↑LCR	[210]
	↓suero/plasma	[218]
Mo	↓suero/plasma	[212], [226]
Co	↑LCR	[210]
	↑↓suero/plasma	↑[226]; ↓[212], [213], [218]
Se	↑↓cerebro	↓[231], [232]; ↑[208], [233]
	↓suero/plasma	[214], [218], [234], [235]
Al	↑cerebro	[42], [209]
	↑suero/plasma	[211], [218], [228], [241]
Hg	↑cerebro	[208], [242]
	↑suero/plasma	[211], [212], [225], [226]
Pb	↓LCR	[225]
	↓suero/plasma	[235]
Cd	↓LCR	[211]
	↑suero/plasma	[211], [212]
As	↓suero/plasma	[217], [228]

Objetivos



Las limitaciones asociadas a las actuales pruebas de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer hacen de vital importancia el descubrimiento de nuevos biomarcadores sensibles y específicos, para lo cual es necesario profundizar en el conocimiento de la etiología exacta de este trastorno neurodegenerativo. Con este propósito, las técnicas ómicas presentan un gran potencial ya que permiten caracterizar de forma integral las perturbaciones bioquímicas asociadas al desarrollo de la enfermedad.

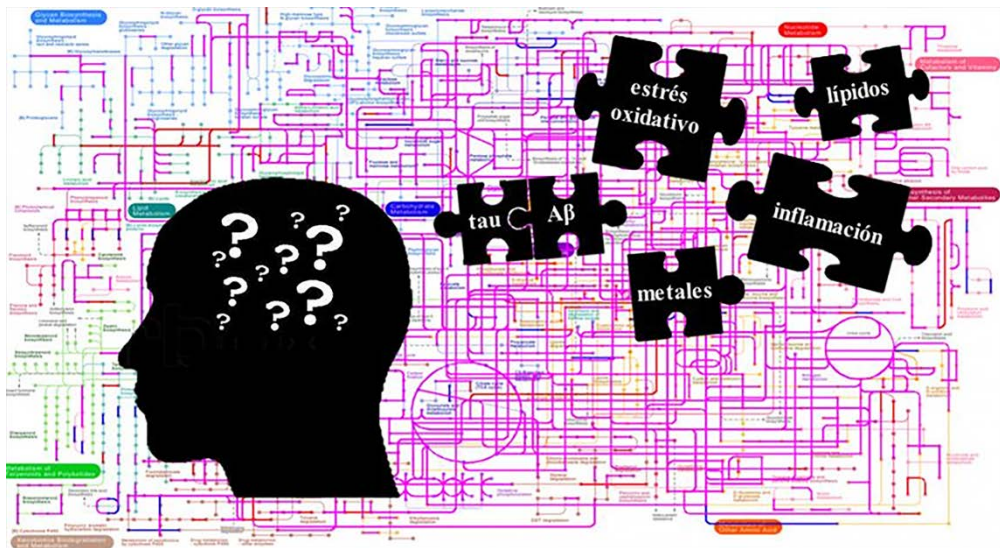
De este modo, el objetivo principal de esta Tesis fue el estudio de los mecanismos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer, así como el descubrimiento de potenciales biomarcadores para su diagnóstico, mediante la aplicación de técnicas metabolómicas y metalómicas. Para ello, los objetivos específicos de los trabajos que componen esta Tesis se pueden resumir en tres puntos.

1. Caracterización de las alteraciones metabólicas y metalómicas asociadas a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y su progresión desde el deterioro cognitivo leve mediante análisis de suero sanguíneo (*Capítulos 1-3*).
2. Análisis metabolómico de suero, cerebro y órganos periféricos del ratón transgénico APP/PS1 para caracterizar de forma integral las perturbaciones metabólicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (*Capítulo 4*).
 - 2.1. Validación del modelo transgénico APP/PS1 mediante la comparación de los perfiles metabolómicos de suero de ratones y pacientes humanos.
 - 2.2. Estudio de las alteraciones neuroquímicas asociadas al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en distintas regiones cerebrales: hipocampo, corteza cerebral, estriado, cerebelo y bulbos olfatorios.
 - 2.3. Evaluación de la implicación del sistema periférico en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer mediante análisis metabolómico de muestras de hígado, riñón, bazo y timo.
3. Estudio de los mecanismos patológicos asociados a la inflamación en la enfermedad de Alzheimer mediante el empleo del modelo transgénico de función inmune deteriorada APP/PS1/IL4-KO (*Capítulo 5*).

Para lograr estos objetivos se optimizaron múltiples procedimientos analíticos complementarios basados en espectrometría de masas para llevar a cabo el análisis metabolómico, lipidómico y metalómico de diversos tejidos y fluidos biológicos.

1. Desarrollo de plataformas metabolómicas y lipidómicas basadas en análisis directo mediante espectrometría de masas (DI-ESI-MS, FIA-APPI-MS).
2. Desarrollo de plataformas metabolómicas basadas en el acoplamiento de técnicas de separación ortogonales y espectrometría de masas (UHPLC-MS, GC-MS, CE-MS).
3. Desarrollo de un procedimiento metalómico basado en el fraccionamiento de metalo-especies mediante precipitación de proteínas en condiciones no desnaturalizantes y posterior análisis mediante ICP-MS.

Procedimientos Experimentales



1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Con objeto de llevar a cabo una investigación exhaustiva de los mecanismos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer y el descubrimiento de potenciales biomarcadores para su diagnóstico precoz, los trabajos desarrollados en esta Tesis se basan en el empleo de tres poblaciones de estudio complementarias.

- **Pacientes de Alzheimer y deterioro cognitivo leve:** muestras de suero sanguíneo. Estudio de la patogénesis de la EA y su progresión desde etapas pre-clínicas.
- **Ratones transgénicos APP/PS1:** muestras de suero sanguíneo, tejido cerebral (hipocampo, corteza, cerebelo, estriado y bulbos olfatorios) y otros órganos periféricos (hígado, riñón, bazo y timo). El empleo de animales modelo posibilita el estudio integral de la patología asociada a la EA mediante el análisis comparativo de distintos compartimentos biológicos, lo cual no es posible en estudios con pacientes humanos.
- **Ratones transgénicos APP/PS1/IL4-KO:** muestras de suero sanguíneo. Estudio de la componente inflamatoria asociada a la EA.

1.1. PACIENTES DE ALZHEIMER Y DETERIORO COGNITIVO LEVE

La población empleada en estos estudios está formada por voluntarios residentes en la provincia de Huelva, con una edad superior a los 65 años, y reclutados por el servicio de Neurología del Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva, España). El primer grupo de estudio son pacientes diagnosticados *de novo* de EA esporádica de acuerdo con los criterios definidos por la NINCDS-ADRDA [46], incluyéndose únicamente sujetos no sometidos a ningún tratamiento farmacológico frente a esta enfermedad. Además, en el estudio también se incluyeron pacientes con DCL, los cuales muestran un deterioro cognitivo significativo y discapacidades en tareas cognitivas objetivas, pero no reúnen los requisitos necesarios para el diagnóstico de EA probable [8]. Por último, el grupo control consta de individuos sanos, emparejados en edad y sexo con los sujetos enfermos, quienes fueron examinados por neurólogos para confirmar la ausencia de desórdenes neurológicos mediante pruebas neuropsicológicas (test MMSE o de Pfeiffer), excluyéndose aquellos casos

con dos o más familiares afectados por la EA. Estos controles sanos fueron reclutados entre voluntarios de la Asociación de Familiares de enfermos de Alzheimer de Huelva y pacientes de los servicios de Oftalmología y Traumatología del Hospital Juan Ramón Jiménez, quienes en el día de la toma de muestra iban a ser sometidos a una intervención quirúrgica por patología benigna.

Tabla 6. Características demográficas de los pacientes reclutados en el estudio.

	Alzheimer	DCL	controles
N	76	17	54
edad	79.8 ± 5.4	76.1 ± 5.5	71.6 ± 5.4
sexo (H/M)	33/43	10/7	22/32
comorbilidades	dislipemia, diabetes tipo II, hipertensión, artrosis, insuficiencia cardiaca, enfermedad de obstrucción pulmonar crónica		
medicamentos	estatinas, metformina, omeprazol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, metamizol, hidroclorotiazida, furosemida, lorazepam		

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa de la región antecubital, siendo recogidas en tubos Vacutainer BD SST II Advance con gel separador y sistema de vacío, previamente enfriados en nevera (2-8 °C), y palometa BD Vacutainer Safety-Lok de 21G. Todas las muestras se tomaron por la mañana (entre las 9:00 y las 12:00) para evitar la influencia del ritmo circadiano, y tras 8 horas de ayuno. Tras la extracción sanguínea, las muestras se refrigeraron durante 30 minutos protegidas de la luz para permitir su coagulación, y a continuación se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el suero de la masa eritrocitaria. Por último, el suero sanguíneo se alícuotó en tubos Eppendorf (alícuotas de 200-300 µL) y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Además, junto a la extracción sanguínea se recogieron una serie de datos clínicos de los pacientes para asegurar la homogeneidad de la población de estudio, incluyendo edad, sexo, medicación y otras enfermedades (Tabla 6). Así, a pesar del elevado número de comorbilidades observadas y tratamientos médicos concomitantes debido a la avanzada edad

de los pacientes incluidos en el estudio, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

El estudio fue realizado de acuerdo con los principios contenidos en la Declaración de Helsinki, y aprobado por el Comité Ético del Hospital Juan Ramón Jiménez y de la Universidad de Huelva. Además, todas las personas reclutadas dieron su consentimiento informado para la extracción sanguínea.

1.2. ANIMALES MODELO: APP/PS1 Y APP/PS1/IL4-KO

Los ratones transgénicos (cepa C57BL/6) fueron proporcionados por el Prof. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla), mientras que los especímenes control de tipo salvaje (WT, *wild type*) fueron adquiridos de Charles River Laboratory. La línea transgénica doble APP/PS1 fue generada mediante la expresión sueca de la mutación en APP y la supresión de PS1 en el exón 9 [64]. Alternativamente, los ratones APP/PS1/IL4-KO se obtuvieron mediante el cruce del ratón IL4 deficiente [76] y el modelo APP/PS1 previamente descrito, lo cual da lugar a un nuevo modelo de función inmune deteriorada. En los estudios desarrollados en esta Tesis se emplearon animales de 6 meses de edad de ambos sexos (APP/PS1: N=30, machos/hembras 13/17; APP/PS1/IL4-KO: N=7, machos/hembras 5/2; WT: N=30, machos/hembras 15/15). Tras su recepción en las instalaciones de la Universidad de Huelva, estos animales fueron aclimatados durante tres días en habitaciones con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de 20-25°C. Durante este periodo de tiempo, los animales tuvieron disponibilidad *ad libitum* de agua y comida.

Los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano, y posteriormente la sangre fue extraída mediante punción cardiaca. Las muestras de sangre se refrigeraron durante 30 minutos protegidas de la luz para permitir su coagulación, y luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el suero sanguíneo. Inmediatamente tras la extracción sanguínea, se realizó la extirpación de los distintos órganos: cerebro, hígado, riñones, bazo y timo. Además, los cerebros fueron diseccionados para separar el hipocampo, corteza cerebral, estriado, cerebelo y bulbos olfatorios. Por último, los distintos tejidos fueron lavados con una solución salina para eliminar restos de sangre, transferidos a tubos Eppendorf

y congelados en nitrógeno líquido. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

La manipulación de estos animales se llevó a cabo de acuerdo con la directiva 2010/63/EU estipulada por la Comunidad Europea, y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Huelva.

2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN ESTUDIOS CON PACIENTES

2.1. PLATAFORMAS METABOLÓMICAS BASADAS EN EL ACOPLAMIENTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS: UHPLC-MS, CE-MS, GC-MS

2.1.1. ANÁLISIS DE SUERO MEDIANTE UHPLC-MS

Para llevar a cabo la precipitación de proteínas, 150 μ L de una mezcla pre-enfriada de metanol-etanol (1:1 v/v) se adicionan sobre 50 μ L de suero, y a continuación la muestra se agita vigorosamente en vórtex y se incuba durante 5 minutos en baño de hielo. Posteriormente, el precipitado proteico se elimina mediante centrifugación a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y el sobrenadante se filtra a través de un filtro de nylon con tamaño de poro de 0.22 μ m.

Los extractos se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (Agilent 1290) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo con fuente de ionización de electrospray (Agilent 6550) [243]. Las separaciones se realizaron en una columna de fase reversa (Zorbax Extend C18, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μ m) termostatzada a 60°C, empleándose un volumen de inyección de 0.5 μ L. Las fases móviles empleadas fueron agua con ácido fórmico al 0.1% (fase A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (fase B), a un flujo de 0.6 mL/min. El gradiente de elución empleado comienza con un contenido inicial del 5% de B durante 1 minuto, seguido de un incremento gradual durante 6 minutos hasta alcanzar un 80% de B, y finalmente el 100% en otros 4.5 minutos. Luego, el sistema regresa a las condiciones iniciales en 0.5 minutos, y la columna se equilibra con 5% de B durante un minuto adicional (tiempo total de la separación: 15 minutos). La detección se realizó mediante adquisición de espectros de barrido completo (*full scan*) en MS en un rango de m/z 50-1000, en polaridad tanto positiva como negativa. El resto de condiciones experimentales (voltajes, temperatura, caudales de gases) se muestran en la Tabla 7.

2.1.2. ANÁLISIS DE SUERO MEDIANTE CE-MS

La desproteínización de las muestras de suero para su análisis metabólico mediante CE-MS se realizó mediante ultrafiltración en filtros de 30 kDa

[244]. Para ello, 100 μ L de suero se mezclan con otros 100 μ L de disolución extractante, la cual contiene 0.4 ppm de metionina sulfona (patrón interno), ácido fórmico 0.2 M y acetonitrilo al 5%. Tras agitar vigorosamente, la mezcla se transfiere al dispositivo de ultrafiltración (Centrifree®, Merck Millipore Ltd.) y se centrifuga a 2000 rpm durante 70 minutos a 4°C, recogiendo el filtrado para su análisis.

Tabla 7. Condiciones experimentales del espectrómetro de masas para los acoplamientos UHPLC-MS y CE-MS.

	UHPLC-MS	CE-MS
voltaje del capilar	3000 V	3500 V
voltaje del fragmentador	175 V	100 V
voltaje del <i>skimmer</i>	65 V	65 V
temperatura	250°C	200°C
gas de secado (N₂)	12 L/min	10 L/min
gas de nebulización (N₂)	52 psi	0-1 min: 0 psi 1-35 min: 10 psi

Los análisis metabolómicos se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis capilar (Agilent 7100) acoplado a un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo e ionización por electrospray (Agilent 6224), haciendo uso de una interfaz de flujo adicional (Agilent G1607) y una bomba de HPLC (Agilent 1200) para proporcionar el líquido de envoltura. Las separaciones electroforéticas se desarrollaron en capilares de sílice fundida de 100 cm de longitud y 50 μ m de diámetro interno, usando una disolución de ácido fórmico 0.8 M en metanol al 10% como electrolito de separación (BGE, *background electrolyte*). El capilar debe pre-lavarse durante 5 minutos con BGE, y posteriormente la muestra se inyecta hidrodinámicamente a 50 mbar durante 50 segundos, seguido por la inyección de BGE durante 20 segundos a 100 mbar. Por último, la separación se produce a 25 mbar de presión con un voltaje de 30 kV durante 35 minutos. La detección se realizó mediante adquisición en polaridad positiva de espectros de barrido completo (*full scan*) en MS en un rango de m/z 85-1000. El líquido de envoltura empleado fue una mezcla de metanol-agua (1:1 v/v) con ácido fórmico 1 mM y patrones de referencia para monitorizar la exactitud de masa (purina 0.5 nM, HP921 0.75 nM), bombeado a 0.6 mL/min con una división de flujo 1:100. El resto de

condiciones experimentales (voltajes, temperatura, caudales de gases) se muestran en la Tabla 7.

2.1.3. ANÁLISIS DE SUERO MEDIANTE GC-MS

Para precipitar las proteínas del suero, 400 μL de una mezcla de metanol-etanol (1:1 v/v) se adicionan sobre 100 μL de suero, y la mezcla se agita durante 5 minutos. A continuación, la muestra se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfiere a otro tubo y se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente, las muestras se derivatizan aplicando el procedimiento descrito por Begley *et al.* [245]. En primer lugar se realiza la protección de los grupos carbonilos mediante metoximación, para lo cual los extractos secos se redisuelven en 50 μL de metoxiamina 20 mg/mL en piridina y se incuban a 80°C durante 15 minutos. Después se lleva a cabo la sililación mediante la adición de 50 μL de MSTFA e incubación a 80°C durante otros 15 minutos. Finalmente, los extractos se centrifugan a 4000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se recoge para su análisis.

Los análisis cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo de gases Trace GC ULTRA acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), usando una columna capilar Factor Four VF-5MS de 30m \times 0.25mm de diámetro interno, con 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (Varian). El horno de columna comienza a una temperatura de 100°C durante 0.5 minutos, y se programa para alcanzar 320°C a una velocidad de 15°C/minuto. Finalmente, esta temperatura se mantiene durante otros 7 minutos, siendo el tiempo total de análisis igual a 22 minutos. La muestra se inyectó en modo *splitless* (1 μl) en un inyector mantenido a temperatura constante (280°C). Además, como gas portador se empleó helio a un flujo de 1 mL/min. La detección en MS se realizó mediante adquisición de espectros de barrido completo (*full scan*) en un rango de m/z 35-650. La ionización se realizó mediante impacto electrónico con un voltaje de 70 eV, ajustándose la temperatura de la fuente de ionización a 200°C.

2.1.4. PRE-PROCESADO DE DATOS

❖ PERFILES DE UHPLC-MS Y CE-MS

Los perfiles metabolómicos obtenidos mediante UHPLC-MS y CE-MS fueron pre-procesados para eliminar el ruido de fondo y señales espurias haciendo uso de la herramienta *Molecular Feature Extraction* del software MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies). El valor de corte de intensidad de pico se ajustó a 200 cuentas, pre-estableciéndose los siguientes aductos para la búsqueda de señales: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H-H_2O]^+$ (modo de ionización positivo); $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$ (modo de ionización negativo, sólo en UHPLC-MS). Además, la tolerancia de separación de pico se ajustó a 0.0025 m/z para realizar el agrupamiento isotópico, y los estados de carga se limitaron a 2. Posteriormente, estos datos se procesaron en el software Mass Profiler Professional (Agilent Technologies) para llevar a cabo el filtrado y el alineamiento. En primer lugar, los perfiles se filtraron para seleccionar únicamente las señales presentes en un rango de tiempos de retención/migración de 0.05-11.5 min para UHPLC-MS y 1-25 min para CE-MS, eliminándose regiones sin interés analítico (e.g. equilibrado de la columna/capilar). Luego los picos se alinearon aplicando una ventana de tiempo de retención de 0.15/2 minutos (UHPLC/CE) y una tolerancia de masas de 20 ppm. Por último, los datos se filtraron para eliminar señales no reproducibles, seleccionándose sólo aquellas señales presentes en al menos el 75% de las muestras de todos los grupos investigados y con un coeficiente de variación inferior al 50% dentro de cada grupo.

❖ PERFILES DE GC-MS

Para procesar los datos de GC-MS se hizo uso del software de acceso libre XCMS, incluido dentro de la plataforma R (<http://www.r-project.org>). Para ello, los archivos se convirtieron en formato netCDF mediante la herramienta de conversión de datos de Thermo Fisher Scientific, y posteriormente se procesaron mediante el método *matchedFilter*. Este algoritmo divide cada perfil metabolómico en diferentes cromatogramas de iones extraídos, empleando un ancho de m/z constante (0.1 Da por defecto), y a continuación cada división del cromatograma se filtra usando una segunda derivada de la función Gaussiana como modelo de forma de pico [246]. Este filtrado requiere de la optimización de dos parámetros para extraer la máxima información posible de acuerdo con las características de los perfiles

obtenidos, el umbral señal/ruido (S/N, *signal-to-noise*) y la anchura de pico a mitad de altura (fwhm, *full width at half-maximum*), los cuales fueron ajustados a un valor de S/N = 2 y fwhm = 3. Tras la búsqueda de los picos, estos deben alineados mediante un proceso en dos etapas, agrupamiento y corrección del tiempo de retención, el cual se realiza en tres ciclos iterativos empleando una ventana de tiempo de retención (*bandwidth*) de 5 segundos (primer ciclo), 3 segundos (segundo ciclo) y 1 segundo (tercer ciclo). Luego se lleva a cabo la imputación de los *missing values* mediante al algoritmo *fillPeaks*, el cual reintegra los picos que se encuentran por debajo del umbral S/N aplicado en la primera etapa. Por último, los datos se normalizan mediante el método LOESS (*locally weighted scatter plot smoothing*), el cual corrige la variabilidad inter-muestral aproximando a cero las diferencias en la intensidad de los picos entre las distintas muestras [247]. Finalmente, los datos se someten a transformación logarítmica para estabilizar la variabilidad de los resultados, y el archivo se convierte en .csv para su posterior análisis estadístico.

2.2. PLATAFORMAS METABOLÓMICAS BASADAS EN ANÁLISIS DIRECTO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS: DI-ESI-MS Y FIA-APPI-MS

2.2.1. EXTRACCIÓN METABOLÓMICA DE SUERO

El tratamiento de las muestras de suero para su análisis metabolómico mediante DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS procede a través de un método de extracción secuencial en dos etapas. En primer lugar, 400 µL de una mezcla de metanol-etanol (1:1 v/v) se adicionan sobre 100 µL de suero para precipitar las proteínas, y a continuación la mezcla se agita durante 5 minutos y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a otro tubo, se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 100 µL de metanol-agua (80:20 v/v) (extracto polar). Por otro lado, el precipitado proteico obtenido en la primera etapa se vuelve a extraer con 400 µL de una mezcla cloroformo-metanol (1:1 v/v) mediante agitación durante 5 minutos, seguido por una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se lleva a sequedad y se reconstituye en 100 µL de diclorometano-metanol (60:40 v/v) (extracto lipofílico). Para el análisis mediante ESI(+)-MS, se adiciona ácido fórmico 0.1% a estos extractos,

mientras que en el análisis en modo negativo no es necesaria la adición de ningún reactivo.

2.2.2. EXTRACCIÓN LIPIDÓMICA DE SUERO

La extracción de lípidos se llevó a cabo mediante un procedimiento derivado del método propuesto por Bligh y Dyer [248]. Para ello, 50 μL de muestra se mezclan con 150 μL de metanol, el cual debe contener acetato amónico 30 mM para el análisis mediante ESI(+)-MS. Tras su agitación vigorosa durante un minuto para provocar la precipitación de las proteínas, se añaden 200 μL de cloroformo. Después de agitar durante un minuto, la mezcla se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y la fase orgánica se recoge para su análisis.

2.2.3. EXTRACCIÓN METABOLÓMICA DE ORINA

Para efectuar la extracción metabolómica de muestras de orina se han comparado tres estrategias diferentes. En todos estos métodos, la orina debe centrifugarse previamente para eliminar partículas en suspensión (6000 rpm, 10 minutos, 4°C) y ajustarse el pH a 7 antes de realizar la extracción.

- **Extracción en fase sólida.** Se compararon tres procedimientos: extracción en fase reversa, en fase normal y de modo mixto, esta última combinando fase reversa con intercambiadores catiónicos y aniónicos. Las características de los cartuchos de SPE empleados y las condiciones experimentales de extracción se recogen en la Tabla 8.
- **Dilución.** Las muestras de orina se diluyen 10 veces con metanol-agua (1:1 v/v).
- **Extracción líquido-líquido.** (a) 500 μL de disolvente orgánico (cloroformo, diclorometano) se adicionan sobre un mismo volumen de orina, la mezcla se agita vigorosamente durante 5 minutos y se centrifuga a 6000 rpm durante 3 minutos para separar el extracto orgánico. (b) 750 μL de una mezcla de orina, metanol y disolvente orgánico (1:1:1 v/v/v) se agita vigorosamente durante 5 minutos y se centrifuga a 6000 rpm durante 3 minutos.

Tabla 8. Condiciones experimentales para la extracción de orina mediante SPE.

	RP-SPE	NP-SPE	MM-SPE
características de los cartuchos SPE			
fase estacionaria	C18	sílice	C18-SO ₃ ⁻ -NR ₃ ⁺
adsorbente (mg)	500 mg		
volumen	3 mL		
condiciones de extracción			
acondicionamiento	2 mL metanol		
equilibrado	2 mL agua	2 mL metanol 5%	-
carga de muestra	1 mL orina	1 mL orina	1.5 mL orina
lavado	2 mL metanol	2 mL metanol 95%	2 mL metanol
elución	1 mL metanol	1 mL metanol 5%	0.5 mL metanol 0.5 mL acetato amónico 10 mM (pH 3) 0.5 mL amoniac 5% (en metanol)

2.2.4. ANÁLISIS MEDIANTE DI-ESI-MS

Los análisis DI-MS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas Q-TOF con fuente de electrospray (QSTAR XL Hybrid system, Applied Biosystems). Las muestras se introducen a un flujo de 5 µL/min usando una bomba de infusión integrada y una jeringa Hamilton de 1 mL. Los datos se obtienen en polaridad tanto positiva como negativa, adquiriéndose espectros de barrido completo durante 0.2 minutos en un rango de m/z 50-1100 (para suero) y m/z 50-500 (para orina). El resto de condiciones experimentales (voltajes, temperatura, caudales de gases) se muestran en la Tabla 9.

2.2.5. ANÁLISIS MEDIANTE FIA-APPI-MS

Para el análisis por inyección en flujo en APPI-MS (QSTAR XL Hybrid system, Applied Biosystems), las muestras se introducen usando un sistema Accela LC (Thermo Fisher Scientific) equipado con un automuestreador y una bomba cuaternaria, empleándose un volumen de inyección de 10 µL. Además,

el dopante se suministró mediante una bomba de jeringa modelo KDS 100 (KD scientific). La optimización de las condiciones FIA se realizó en cuatro fases: tipo de dopante, tipo de disolvente portador, flujo de disolvente y flujo de dopante. Finalmente, el fluido portador empleado fue metanol a un flujo de 50/100 $\mu\text{L}/\text{min}$, en modo positivo y negativo respectivamente, mientras que el dopante óptimo fue tolueno, a un flujo de 20/40 $\mu\text{L}/\text{min}$, en cada modo de ionización. La detección en MS se realizó en polaridad tanto positiva como negativa, adquiriéndose espectros de barrido completo en un rango de m/z 50-1100. El resto de condiciones experimentales del MS (voltajes, temperatura, caudales de gases) se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones experimentales del espectrómetro de masas para las plataformas DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS.

	ESI(+)	ESI(-)	APPI(+)	APPI(-)
<i>ion spray voltage</i>	3300 V	-4000 V	1500 V	-2300 V
<i>declustering potential</i>	60 V	-100 V	50 V	-50 V
<i>focusing potential</i>	250 V	-250 V	250 V	-250 V
gas de cortina (N₂)	1.13 L/min			
gas de nebulización (N₂)	1.56 L/min			
<i>heater gas (N₂)</i>	0		3 L/min	
gas de lámpara (N₂)	-		1 L/min	
temperatura	60°C		400°C	

2.2.6. PRE-PROCESADO DE DATOS

El tratamiento de los datos obtenidos mediante DI/FIA-MS se limita a la etapa de detección de picos y filtrado, ya que la ausencia de un proceso previo de separación cromatográfica/electroforética hace innecesario realizar un alineamiento. En los trabajos desarrollados en esta Tesis, los datos metabólicos obtenidos mediante estas técnicas fueron procesados haciendo uso del software Markerview™ (Applied Biosystems). Para ello, la búsqueda de picos se hizo en intervalos de m/z de 0.1 Da, considerándose todas aquellas señales con una intensidad superior a 10 cuentas. Finalmente, los resultados se normalizaron en función de la suma de áreas totales.

2.3. ANÁLISIS DE FOSFOLÍPIDOS EN SUERO MEDIANTE RP-UHPLC-ESI/ICP-MS

Las muestras de suero se trataron siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Zhao *et al.* para la extracción de fosfolípidos y liso-fosfolípidos [249]. Con este propósito, 50 μ L de suero se mezclan con 500 μ L de metanol, y tras agitar durante 5 minutos la muestra se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recoge en un nuevo tubo, se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 50 μ L de metanol.

Para llevar cabo el análisis dirigido de las distintas especies de fosfolípidos, éstas se separan por cromatografía líquida de fase reversa y se detectan complementariamente mediante espectrometría de masas molecular (ESI-MS) y atómica (ICP-MS).

Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase reversa (Hypersil Gold C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m) termostatazada a 60°C, con un volumen de inyección de 5 μ L. Las fases móviles empleadas fueron una disolución acuosa de acetato amónico 10 mM (fase A) y metanol (fase B), a un flujo de 0.5 mL/min. El programa de elución optimizado fue el siguiente: 0 min, 50% B; 2 min, 65% B; 15 min, 85% B; 15-25 min, 85% B; 35 min, 100% B. Finalmente, el sistema regresa a las condiciones iniciales en 2 minutos, y la columna se equilibra durante un minuto en 50% de B.

La detección mediante ESI-MS (QSTAR XL Hybrid system, Applied Biosystems) se realizó en modo *full scan*, m/z 400-1000, en polaridad tanto positiva como negativa. El voltaje de *ion spray* se ajustó a 5000 V en modo positivo y -2500 V en modo negativo. Los caudales de gas de cortina, gas de nebulización y *heater gas* fueron de 1.48 L/min, 1.56 L/min y 5.5 L/min, respectivamente. La temperatura de la fuente ESI se mantuvo a 400°C, y los potenciales de *declustering* y *focusing* se ajustaron según los valores previamente descritos en la Tabla 9 para análisis mediante DI-ESI-MS.

Por último, para detectar de forma selectiva los fosfolípidos se desarrolló un acoplamiento UHPLC-ICP-MS. Para ello se empleó un ICP-MS con celda de colisión/reacción (Agilent 7500ce), equipado con un nebulizador MicroMist y conos de muestreo y *skimmer* de platino. Para prevenir la deposición de carbón debido a la fase móvil orgánica se introdujo un gas opcional (oxígeno 21%, en argón) a través de una pieza en T que conecta la cámara de

nebulización y la antorcha. Además, como el fósforo es un elemento difícil de analizar mediante ICP-Q-MS debido a interferencias poliatómicas (e.g. $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}$, m/z 31), la adición de oxígeno permite la detección de este elemento en su forma oxidada (i.e. $^{47}\text{PO}^+$), libre de interferencias. Por lo tanto, el análisis de fosfolípidos en UHPLC-ICP-MS se realizó mediante la monitorización de m/z 47, con un *dwell time* de 0.3 segundos por punto. Los caudales de gas de plasma, gas auxiliar, gas portador y gas de *make-up* se fijaron a 15 L/min, 1 L/min, 1 L/min, y 0.15 L/min, respectivamente, mientras que el gas opcional se ajustó a un 40% del flujo de gas portador. Otros parámetros optimizados fueron el *forward power* (1500 W), la temperatura de la cámara de nebulización (-5°C) y la distancia antorcha-interfaz (7 mm).

2.4. ANÁLISIS METALÓMICO DE SUERO EN ICP-MS

2.4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El procedimiento metalómico desarrollado en los trabajos incluidos en esta Tesis se basa en la precipitación de proteínas en condiciones no desnaturizantes para realizar el fraccionamiento de las metalo-especies presentes en suero sanguíneo según su peso molecular.

Con este fin, 300 μL de acetona fría se añaden gota a gota sobre 150 μL de suero, y la mezcla se incuba en baño de hielo durante 10 minutos para provocar la precipitación de las proteínas. Posteriormente, la muestra se centrifuga a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante que contiene las especies de bajo peso molecular (LMM, *low molecular mass*) del precipitado formado principalmente por (metalo)-proteínas (HMM, *high molecular mass*). El sobrenadante se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 750 μL de una disolución de rodio 1 g/L (patrón interno). Además, el precipitado se somete a digestión ácida asistida por microondas para poder determinar el contenido metálico en la fracción HMM. Para ello, el precipitado se introduce en un vaso de teflón junto con 500 μL de una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (4:1 v/v). La mineralización se lleva a cabo en un horno de microondas a 400 W de potencia (MARS, CEM Matthews), mediante un programa de temperaturas que alcanza los 150°C en 10 minutos, y a continuación mantiene esta temperatura durante otros 10 minutos. Finalmente, los extractos se llevan a 2

mL con agua ultra pura, se añade rodio 1 g/L, y se filtran a través de un tamaño de poro de 0.45 μm usando filtros de PTFE.

Alternativamente, el contenido total de metales en estas muestras de suero (TOTAL) se determinó mediante simple dilución. Para ello, el suero se diluye 5 veces con agua ultra pura y se añade rodio hasta una concentración final de 1 g/L.

2.4.2. ANÁLISIS MULTI-ELEMENTAL MEDIANTE ICP-MS

El análisis multi-elemental de las distintas fracciones (LMM, HMM, TOTAL) se realizó mediante ICP-MS con celda de colisión/reacción (Agilent 7500ce), equipado con un nebulizador MicroMist y conos de muestreo y *skimmer* de platino, y usando helio como gas de colisión. Las condiciones instrumentales se optimizaron usando una disolución de sintonización (Li, Co, Y y Tl a 1 $\mu\text{g/L}$). Los caudales de gas de plasma, gas auxiliar, gas portador, gas de *make-up*, y gas de colisión se fijaron a 15 L/min, 1 L/min, 1 L/min, 0.15 L/min y 3.5 mL/min, respectivamente. Los isótopos monitorizados fueron ^7Li , ^{29}Al , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{64}Zn , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{78}Se , ^{82}Se , ^{95}Mo , ^{98}Mo , ^{103}Rh , ^{112}Cd , ^{114}Cd y ^{208}Pb , con un *dwell time* de 0.3 segundos por isótopo. Otros parámetros optimizados fueron el *forward power* (1500 W), la temperatura de la cámara de nebulización (2°C) y la distancia antorcha-interfaz (7 mm).

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN ESTUDIOS CON RATONES

3.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

3.1.1. EXTRACCIÓN METABOLÓMICA DE SUERO

El tratamiento de las muestras de suero para su análisis metabolómico procede a través de un método de extracción secuencial en dos etapas. En primer lugar, 400 μL de una mezcla de metanol-etanol (1:1 v/v) se adicionan sobre 100 μL de suero para precipitar las proteínas, y a continuación la mezcla se agita durante 5 minutos y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a otro tubo, se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 100 μL de metanol-agua (80:20 v/v) con ácido fórmico al 0.1% (extracto polar). Por otro lado, el precipitado proteico obtenido en la primera etapa se vuelve a extraer con 400 μL de una mezcla cloroformo-metanol (1:1 v/v) mediante agitación durante 5 minutos, seguido por una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se lleva a sequedad y se reconstituye en 100 μL de diclorometano-metanol (60:40 v/v) con formiato amónico 10 mM (extracto lipofílico).

3.1.2. EXTRACCIÓN METABOLÓMICA DE TEJIDOS

Los distintos órganos del ratón APP/PS1 fueron extraídos mediante el empleo de un *pellet mixer* para llevar a cabo la disrupción celular (VWR International). Además, los órganos de mayor tamaño (*i.e.* cerebelo, corteza, hígado, riñones, bazo, timo) fueron pre-homogeneizados durante 30 segundos en un homogeneizador criogénico Freezer/Mills 6770 (SPEX SamplePrep) para facilitar la pesada, mientras que en el caso de tejidos más pequeños se empleó el órgano entero.

El procedimiento de extracción optimizado consta de una sola etapa para las muestras de tejido cerebral, pero el elevado contenido de lípidos neutros del resto de órganos (*i.e.* hígado, riñones, bazo, timo) hace necesario el uso de una segunda etapa de extracción. En primer lugar, 30 mg de tejido homogeneizado (o el órgano entero en el caso de estriado, hipocampo y bulbo olfatorio) se mezclan con 10 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de metanol pre-enfriado con ácido fórmico al 0.1%. La extracción se realiza en baño de hielo durante dos minutos con la ayuda del

pellet mixer, y a continuación la muestra se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a otro tubo (extracto polar), y el precipitado se vuelve a extraer para recuperar la fracción lipídica (sólo para hígado, riñones, bazo y timo). Para ello, se adicionan 10 µL/mg de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con ácido fórmico al 0.1% y formiato amónico 10 mM, y la mezcla se vuelve a homogeneizar y centrifugar como se ha descrito anteriormente, obteniéndose el segundo extracto (lipofílico).

3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS METABOLÓMICO

Los extractos obtenidos según los procedimientos de tratamiento de muestra descritos en el apartado anterior fueron analizados mediante distintas plataformas metabolómicas complementarias: UHPLC-MS, GC-MS, DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS (ésta última sólo para el análisis de muestras de suero). Las técnicas de introducción directa de muestra, combinadas con un protocolo de extracción secuencial en dos etapas y análisis en modos de ionización positivo y negativo, permiten la detección de metabolitos de naturaleza muy diversa. Sin embargo, la separación de las distintas especies de lípidos neutros (*e.g.* triglicéridos) mediante RP-LC requiere de gradientes de elución prolongados, por lo que esta técnica sólo se aplicó a los extractos polares. Del mismo modo, debido a las limitaciones de volatilidad en GC-MS, los extractos lipofílicos tampoco se estudiaron mediante esta plataforma.

3.2.1. ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE UHPLC-MS

Las muestras (sólo extractos polares) se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (Accela LC system, Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo con fuente de ionización de electrospray (QSTAR XL Hybrid system, Applied Biosystems). La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa (Hypersil Gold C18, 2.1×50 mm, 1.9 µm) termostata a 50°C, con un volumen de inyección de 5 µL. Las fases móviles empleadas fueron metanol (fase A) y agua (fase B), ambas con ácido fórmico 0.1% y formiato amónico 10 mM, a un flujo de 0.5 mL/min. El gradiente de elución optimizado fu el siguiente: 0-1 min, 95% B; 2.5 min, 25% B; 8.5-10 min, 0% B; 10.1-12 min, 95% B. La detección se realizó en modo *full scan*, en polaridad tanto positiva como negativa, en un rango de *m/z* 50-1100. El

voltaje de *ion spray* se ajustó a 5000 V en modo positivo y -2500 V en modo negativo. Los caudales de gas de cortina, gas de nebulización y *heater gas* fueron de 1.48 L/min, 1.56 L/min y 6.25 L/min, respectivamente. La temperatura de la fuente ESI se mantuvo a 400°C, con un *declustering potential* de 100 V/-120 V y un *focusing potential* de ± 350 V.

3.2.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE GC-MS

Antes de llevar a cabo el análisis mediante GC-MS, los extractos (sólo extractos polares) fueron derivatizados mediante el procedimiento previamente descrito (sección 2.1.3). Posteriormente, los análisis cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo de gases Trace GC ULTRA acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), usando una columna capilar Factor Four VF-5MS de 30m×0.25mm de diámetro interno, con 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (Varian). La temperatura de columna se ajustó a 100°C durante 0.5 minutos, y se programó para alcanzar 320°C a una velocidad de 15°C por minuto. Finalmente, esta temperatura se mantuvo durante otros 2.8 minutos, siendo el tiempo total de análisis igual a 18 minutos. La muestra se inyectó en modo *splitless* (1 μl) en un inyector mantenido a temperatura constante (280°C). Además, como gas portador se empleó helio a un flujo de 1 mL/min. La detección en MS se realizó mediante ionización por impacto electrónico (70 eV) y adquisición de espectros en modo *full scan* en un rango de m/z 35-650. La temperatura de la fuente de ionización se fijó a 200°C.

3.2.3. ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE DI/FIA-MS

Para analizar las muestras procedentes de ratones transgénicos APP/PS1 y APP/PS1/IL4-KO mediante DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS se emplearon las condiciones experimentales previamente optimizadas para el estudio de muestras de suero de pacientes humanos de la enfermedad de Alzheimer (secciones 2.2.4 y 2.2.5).

En el caso de muestras de tejidos, los extractos polares se analizaron complementariamente mediante ESI(+) y ESI(-) para obtener una visión integral del metaboloma. Sin embargo, los extractos lipofílicos fueron exclusivamente analizados mediante ESI(+)-MS, ya que estos extractos principalmente contienen lípidos neutros, los cuales sólo pueden ser ionizados

en modo positivo mediante la formación de aductos con iones cargados (*e.g.* $[M+NH_4]^+$) [250].

3.2.4. PRE-PROCESADO DE DATOS

Los datos obtenidos mediante plataformas metabolómicas basadas en acoplamiento con UHPLC y GC fueron procesados haciendo uso del software XCMS. Los archivos de UHPLC-MS se convirtieron en formato mzXML usando la herramienta *msConverter* (ProteoWizard), mientras que los datos de GC-MS se convirtieron en netCDF mediante la herramienta de conversión de datos de Thermo Fisher Scientific. Posteriormente, estos datos se procesaron mediante el método *matchedFilter*, empleándose un valor de $S/N = 2$ para ambas plataformas, mientras que el *fwhm* se ajustó a 10 para UHPLC-MS y 3 para GC-MS, teniendo en cuenta la mayor anchura de pico obtenida normalmente en LC. Tras la búsqueda de los picos, el alineamiento se realizó en tres ciclos iterativos, descendiendo el valor de *bandwidth* de 5 a 1 segundo en GC-MS, y de 10 a 1 segundo en UHPLC-MS. A continuación se aplicaron los algoritmos de imputación de *missing values* (*fillPeaks*) y normalización (LOESS), y por último los resultados se transforman logarítmicamente para estabilizar la variabilidad de los resultados.

En el caso de datos obtenidos mediante DI/FIA-MS, el procesado se lleva a cabo según el procedimiento descrito en la sección 2.2.6, el cual se basa en la búsqueda de picos en intervalos de m/z de 0.1 Da, considerándose todas aquellas señales con una intensidad superior a 10 cuentas, y posterior normalizaron en función de la suma de áreas totales.

4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los datos metabolómicos obtenidos en los trabajos desarrollados en esta Tesis se realizó mediante la aplicación de múltiples herramientas estadísticas y bioinformáticas, como se describe a continuación.

❖ TÉCNICAS DE ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Las técnicas estadísticas de análisis multivariante permiten comparar los perfiles metabolómicos/metalómicos obtenidos con el fin de crear modelos de clasificación y predictivos para realizar la búsqueda de compuestos discriminantes. Las herramientas empleadas en estos estudios fueron el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), usando el software SIMCA-PTM (versión 11.5, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Antes de realizar el análisis estadístico, los datos fueron sometidos a transformación logarítmica y escalado de Pareto para minimizar la variabilidad técnica inter-muestral [128]. La validación de estos modelos se realizó mediante los valores R^2 y Q^2 proporcionados por el software, los cuales son indicativos de la separación de clases y el poder predictivo del modelo, respectivamente. Estos parámetros varían en el rango 0-1, e indican la varianza explicada por el modelo para todos los datos analizados (R^2) y la varianza observada en una validación cruzada (Q^2). Finalmente, los compuestos discriminantes pueden seleccionarse de acuerdo con el parámetro VIP (*Variable Importance in the Projection*), una suma ponderada del cuadrado del peso en PLS de cada variable, indicativo de la importancia de los distintos compuestos en el modelo.

❖ VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES

Con el objetivo de validar los compuestos identificados mediante PLS-DA, se aplicaron distintas técnicas de análisis univariante, tanto paramétricas (t-test, ANOVA) como no paramétricas (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis), haciendo uso del software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Además, estos potenciales marcadores fueron sometidos a análisis de curvas ROC en el software GraphPad Prism (version 6.04, Intuitive Software for Science, San Diego, CA) para comprobar su capacidad diagnóstica. El área bajo la curva se empleó para determinar la sensibilidad y especificidad de estos compuestos, de modo que un biomarcador se considera excelente cuando el valor de AUC

supera 0.9, bueno si se encuentra en el rango 0.8-0.9, moderado entre 0.7-0.8 y pobre si AUC es menor a 0.7 [131].

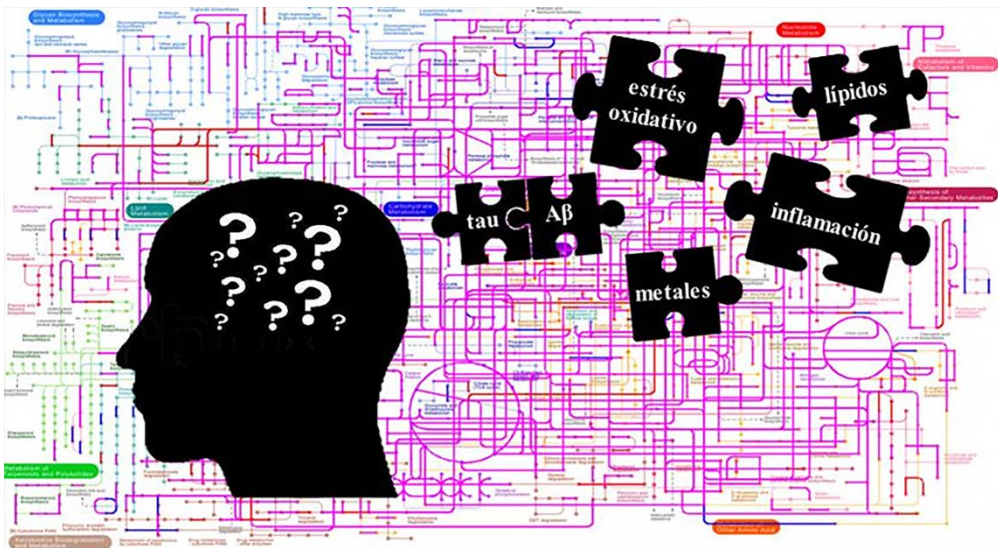
❖ ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Los análisis de correlación se realizaron mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman en el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

❖ ANÁLISIS DE RUTAS METABÓLICAS

El análisis de rutas metabólicas permite identificar y visualizar las rutas asociadas a las anomalías identificadas en un estudio metabólico. Con este propósito, en los estudios presentados en esta Tesis se empleó la herramienta MetPA (<http://metpa.metabolomics.ca>), la cual se basa en la combinación de análisis de enriquecimiento y análisis topológico de rutas metabólicas [251]. Para ello se seleccionaron las librerías correspondientes (*Homo sapiens* o *Mus musculus*), y se usaron los algoritmos ‘*Hypergeometric Test*’ y ‘*Relative-Betweenness Centrality*’ para realizar los análisis de enriquecimiento y topológico, respectivamente. Los resultados de este análisis se visualizan en un gráfico donde se representa el valor de p para cada ruta metabólica frente a un valor calculado que indica la importancia de esa ruta en respuesta a la condición investigada (*pathway impact*). De este modo, en este gráfico cada nodo representa una ruta bioquímica y su tamaño indica su implicación en las anomalías metabólicas observadas. Para seleccionar las rutas metabólicas más relevantes, se aplicó un valor de corte de *pathway impact* igual a 0.1.

Resultados y Discusión



CAPÍTULO 1

DESARROLLO DE TÉCNICAS METABOLÓMICAS DE SCREENING BASADAS EN ANÁLISIS DIRECTO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Artículo 1. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem* 406:7137-7148.

Artículo 2. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2012). Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry. *Chem Papers* 66:829-835.

Artículo 3. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 98:321-326.

Artículo 4. Raúl González-Domínguez, Rocío Castilla-Quintero, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry. *Anal Biochem* 465:20-27.

Artículo 5. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Application of a novel metabolomics approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease. *Talanta* 131:480-489.

Artículo 6. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics* 104:37-47.

Capítulo 1

Los artículos relacionados más abajo han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU), enlace a la revista y resumen.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 406, n. 28, págs. 7137-7148, (2014). DOI: 10.1007%2Fs00216-014-8102-3

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00216-014-8102-3>

RESUMEN:

Currently, there is no cure for Alzheimer's disease and early diagnosis is very difficult, since no biomarkers have been established with the necessary reliability and specificity. For the discovery of new biomarkers, the application of omics is emerging, especially metabolomics based on the use of mass spectrometry. In this work, an analytical approach based on direct infusion electrospray mass spectrometry was applied for the first time to blood serum samples in order to elucidate discriminant metabolites. Complementary methodologies of extraction and mass spectrometry analysis were employed for comprehensive metabolic fingerprinting. Finally, the application of multivariate statistical tools allowed us to discriminate Alzheimer patients and healthy controls, and identify some compounds as potential markers of disease. This approach provided a global vision of disease, given that some important metabolic pathways could be studied, such as membrane destabilization processes, oxidative stress, hypometabolism, or neurotransmission alterations. Most remarkable results are the high levels of phospholipids containing saturated fatty acids, respectively, polyunsaturated ones and the high concentration of whole free fatty acids in Alzheimer's serum samples. Thus, these results represent an interesting approximation to understand the pathogenesis of disease and the identification of potential biomarkers.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry". Chemical Papers. Vol. 66, n. 9, págs. 829-835, (2012). DOI: 10.2478%2Fs11696-012-0184-9

Enlace al texto completo del artículo:

<https://dx.doi.org/10.2478%2Fs11696-012-0184-9>

RESUMEN:

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease, but there is still no cure and early diagnosis remains very difficult. For this reason, the discovery of new biomarkers is of great importance. The application of metabolomics is emerging in this field, based on the use of mass spectrometry as a technique of analysis. In this work, blood serum samples (from Alzheimer's disease patients and healthy controls) were analysed by mass spectrometry in order to search for potential metabolomic biomarkers. The application of multivariate statistical tools (PLS-DA) enabled us to discriminate between groups. In addition, some phosphatidylcholine compounds were identified as markers of the disease.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 98, págs.. 321-326, (2014). DOI: 10.1016/j.jpba.2014.05.023

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.023>

RESUMEN:

In this study, we demonstrated the potential of direct infusion mass spectrometry for the lipidomic characterization of Alzheimer's disease. Serum samples were extracted for lipids recovery, and directly analyzed using an electrospray source. Metabolomic fingerprints were subjected to multivariate analysis in order to discriminate between groups of patients and healthy controls, and then some key-compounds were identified as possible markers of Alzheimer's disease. Major differences were found in lipids, although some low molecular weight metabolites also showed significant changes. Thus, important metabolic pathways involved in neurodegeneration could be studied on the basis of these perturbations, such as membrane breakdown (phospholipids and diacylglycerols), oxidative stress (prostaglandins, imidazole and histidine), alterations in neurotransmission systems (oleamide and putrescine) and hyperammonaemia (guanidine and arginine). Moreover, it is noteworthy that some of these potential biomarkers have not been previously described for Alzheimer's disease.

- González Domínguez, R., Castilla Quintero, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry". *Analytical Biochemistry*. Vol. 465, págs.. 20-27, (2014). DOI: 10.1016/j.ab.2014.07.016

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016>

RESUMEN:

The analysis of urine by direct infusion mass spectrometry suffers from ion suppression due to its high salt content and inter-sample variability caused by the differences in urine volume between persons. Thus, urine metabolomics requires a careful selection of the sample preparation procedure and a normalization strategy to deal with these problems. Several approaches were tested for metabolomic analysis of urine samples by direct infusion electrospray mass spectrometry (DI-ESI-MS), including solid phase extraction, liquid-liquid extraction, and sample dilution. In addition, normalization of results based on conductivity values and statistical treatment was performed to minimize sample variability. Both urine dilution and solid phase extraction with mixed mode sorbent considerably reduced the salt content in urine, providing comprehensive metabolomic fingerprints. Moreover, statistical data normalization enabled the correction of inter-sample physiological variability, improving the quality of results obtained. Therefore, high-throughput DI-ESI-MS fingerprinting of urine samples can be achieved with simple pretreatment procedures allowing the use of this noninvasive sampling in metabolomics. Finally, the optimized approach was tested in a pilot metabolomic investigation of urine samples from transgenic mice models of Alzheimer's disease (APP/PS1) in order to illustrate the potential of the methodology.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Application of a novel metabolomics approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease". *Talanta* Vol. 131, págs. 480-489, (2015). DOI: 10.1016/j.talanta.2014.07.075

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.075>

RESUMEN:

The use of atmospheric pressure photoionization is not widespread in metabolomics, despite its considerable potential for the simultaneous analysis of compounds with diverse polarities. This work considers the development of a novel analytical approach based on flow injection analysis and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for rapid metabolic screening of serum samples. Several experimental parameters were optimized, such as type of dopant, flow injection solvent, and their flows, given that a careful selection of these variables is mandatory for a comprehensive analysis of metabolites. Toluene and methanol were the most suitable dopant and flow injection solvent, respectively. Moreover, analysis in negative mode

required higher solvent and dopant flows (100 $\mu\text{l min}^{-1}$ and 40 $\mu\text{l min}^{-1}$, respectively) compared to positive mode (50 $\mu\text{l min}^{-1}$ and 20 $\mu\text{l min}^{-1}$). Then, the optimized approach was used to elucidate metabolic alterations associated with Alzheimer's disease. Thereby, results confirm the increase of diacylglycerols, ceramides, ceramide-1-phosphate and free fatty acids, indicating membrane destabilization processes, and reduction of fatty acid amides and several neurotransmitters related to impairments in neuronal transmission, among others. Therefore, it could be concluded that this metabolomic tool presents a great potential for analysis of biological samples, considering its high-throughput screening capability, fast analysis and comprehensive metabolite coverage.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease ".*Journal of Proteomics*. Vol. 104, págs.. 37-47, (2015). DOI: 10.1016/j.jprot.2014.01.014

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.014>

RESUMEN:

Alzheimer's disease is closely related to abnormal metabolism of phospholipids from neural membranes, so that the study of their dyshomeostasis could be of great interest for the discovery of potential biomarkers for diagnosis and disease monitoring. In this work, it has been developed a metabolomic multi-platform for the characterization of phospholipid alterations occurring in serum from Alzheimer's disease patients. For this purpose, we performed a metabolomic screening by direct infusion mass spectrometry and profiling analysis by reversed phase ultra-high performance liquid chromatography with complementary detection by molecular and atomic mass spectrometry, which allowed combining the high-throughput capability of shotgun metabolomics and the targeted character of profiling approaches. Thus significant changes were detected in the levels of several molecular species of phosphatidylcholines, phosphatidylethanolamines, plasmenylcholines, plasmenylethanolamines and different classes of lysophospholipids, which provided a global vision of the possible factors triggering membrane breakdown. In this sense, alterations of phospholipids metabolism appears to have a multifactorial origin involving overactivation of phospholipases, increased anabolism of lysophospholipids, peroxisomal dysfunction, imbalances in the levels of saturated/unsaturated fatty acids contained in the structure of phospholipids and oxidative stress.

Las plataformas analíticas normalmente empleadas en metabolómica se basan en el acoplamiento de distintas técnicas de separación con espectrometría de masas. Sin embargo, el elevado tiempo de análisis asociado a estas técnicas ha conducido en los últimos años al desarrollo de otras metodologías complementarias con un mayor rendimiento analítico. Así, el primer objetivo de esta Tesis es la optimización de procedimientos metabolómicos basados en análisis directo de diversos fluidos biológicos mediante espectrometría de masas (*i.e.* infusión directa, inyección en flujo), y su posterior aplicación para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Además, la disponibilidad de múltiples fuentes de ionización a presión atmosférica es de gran utilidad para abordar la caracterización integral del conjunto de todos los metabolitos de un sistema biológico. Por ello, en los trabajos que componen este Capítulo se emplearon dos sistemas de ionización complementarios: el electrospray y la fotoionización a presión atmosférica.

El procedimiento metabolómico optimizado para llevar a cabo el análisis directo de muestras de suero sanguíneo aún un protocolo de extracción secuencial en dos etapas para la recuperación de una amplia gama de metabolitos, combinado con detección mediante MS en polaridad tanto positiva como negativa y el uso complementario de fuentes ESI y APPI. El método desarrollado para el tratamiento de muestras consta de una primera etapa de precipitación proteica y extracción de metabolitos polares, y una segunda etapa extractiva para la recuperación de los componentes lipídicos que pueden quedar adsorbidos en el precipitado de proteínas. Además, se evaluaron distintos factores de dilución con el fin de minimizar la supresión iónica causada por la matriz. La máxima sensibilidad se observó empleándose un volumen de reconstitución igual a 100 μL , ya que en el caso de muestras más concentradas el número total de iones se ve incrementado causando una considerable supresión iónica, mientras que a mayores diluciones el efecto beneficioso de una supresión reducida no compensa la correspondiente pérdida de sensibilidad. Posteriormente, el análisis mediante DI-ESI-MS permitió obtener perfiles metabólicos característicos de las muestras de suero, gracias a la capacidad que presenta el electrospray de ionizar compuestos en un amplio rango de masas y polaridades. Alternativamente, la plataforma FIA-APPI-MS puede complementar al electrospray para el análisis de compuestos de baja polaridad. Los parámetros del sistema Q-TOF-MS se optimizaron para obtener la máxima sensibilidad con la menor fragmentación

posible en cada una de las fuentes de ionización en ambas polaridades (*i.e.* ESI+, ESI-, APPI+, APPI-). Sin embargo, el uso de APPI-MS requiere de la optimización adicional de otras condiciones experimentales para asegurar un análisis metabolómico no sesgado (ver Introducción, sección 2.3.2). En este estudio se compararon distintos tipos de disolventes portadores (metanol, acetonitrilo, metanol-agua 1:1, isopropanol) y dopantes (tolueno, anisol, clorobenceno), empleándose caudales en el rango de 50-500 $\mu\text{L}/\text{min}$ para el disolvente, mientras que el flujo de dopante se ajustó a un 10-50% del flujo portador. Para evaluar la eficiencia de la fotoionización en cada una de las condiciones experimentales ensayadas se empleó una mezcla de metabolitos representativos de suero sanguíneo (Figuras 1-4, Artículo 5). Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron empleándose metanol como fluido portador a un flujo de 50/100 $\mu\text{L}/\text{min}$, en modo positivo y negativo respetivamente, mientras que el dopante óptimo fue tolueno, a un flujo de 20/40 $\mu\text{L}/\text{min}$, en cada modo de ionización.

Complementariamente se desarrolló un procedimiento lipidómico basado en la extracción de la fracción lipídica del suero mediante una modificación del método de Bligh y Dyer, y posterior análisis mediante DI-ESI-MS. De este modo pudieron detectarse un gran número de compuestos, incluyéndose fosfolípidos, tri- y di-glicéridos o derivados del colesterol, muchos de los cuales son difícilmente analizables mediante otros procedimientos metabolómicos convencionales.

Por último, la plataforma metabolómica DI-ESI-MS previamente descrita se adaptó para el análisis de muestras de orina, un fluido biológico de gran interés en biomedicina gracias a su fácil disponibilidad de modo no invasivo. Sin embargo, el análisis de orina mediante espectrometría de masas presenta dos grandes inconvenientes relacionados con la supresión iónica causada por el elevado contenido salino de este fluido y la variabilidad inter-muestral debida a las diferencias en el volumen de orina excretado entre distintos individuos. Con el fin de minimizar la supresión iónica se ensayaron distintos procedimientos de preparación de muestra, incluyendo extracción en fase sólida, dilución y extracción líquido-líquido. Los mejores resultados se obtuvieron mediante dilución ($\times 10$) y extracción en fase sólida de modo mixto, ya que el resto de procedimientos de extracción (LLE, RP-SPE, NP-SPE) son más selectivos y producen perfiles metabólicos sesgados. Por otro lado, para reducir la variabilidad biológica entre muestras de orina se evaluó

la necesidad del empleo de un método de normalización. Finalmente, la normalización estadística mediante el método LOESS (*locally weighted scatter plot smoothing*), el cual se basa en la corrección de la variabilidad inter-muestral mediante la aproximación a cero de las diferencias en la intensidad de los picos entre las distintas muestras, proporcionó los mejores resultados, mejorando significativamente la calidad de los datos metabolómicos.

Estos procedimientos metabolómicos/lipidómicos basados en análisis directo presentaron una serie de ventajas frente a las plataformas convencionales basadas en el acoplamiento de MS con técnicas de separación, como se resume en los siguientes puntos.

- La ausencia de una etapa previa de separación posibilita la determinación de múltiples metabolitos de naturaleza muy diversa.
- El tiempo total de análisis es muy reducido (menor a un minuto por muestra), lo cual minimiza la deriva instrumental a lo largo del periodo de análisis y en consecuencia aumenta la reproducibilidad inter-muestral.
- La introducción directa de muestras simplifica el diseño instrumental y facilita el posterior procesado de datos.

Por todo ello, las técnicas basadas en DI/FIA-MS muestran un gran potencial para llevar a cabo un *screening* metabólico rápido, aunque presentan importantes limitaciones asociadas a la supresión iónica y la imposibilidad de diferenciar compuestos isobáricos, lo que hace necesario el posterior empleo de técnicas acopladas para confirmar y profundizar en los resultados preliminares obtenidos.

La aplicación de estas técnicas en muestras de pacientes de EA y controles sanos permitió detectar alteraciones en los niveles de numerosos metabolitos (Tabla 10), los cuales pudieron relacionarse con múltiples fallos en distintas rutas metabólicas. En el Capítulo 2 se describe como estas perturbaciones fueron posteriormente confirmadas mediante el empleo de otras plataformas metabolómicas ortogonales (*i.e.* UHPLC/GC/CE-MS), y se proporciona una interpretación más exhaustiva sobre los mecanismos patológicos subyacentes

a la enfermedad de Alzheimer potencialmente relacionados con estos cambios metabólicos.

Tabla 10. Alteraciones metabólicas detectadas en suero de pacientes de EA mediante DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS.

metabolitos	
estrés oxidativo	↑prostaglandinas, leukotrieno B4; ↓histidina, imidazol, ácido docosahexaenoico
metabolismo energético	↑glucosa, alanina; ↓creatina, carnitina, ácido málico
neurotransmisión	↓ dopamina, serotonina, glutamato, glutamina, N-acetil-glutamina, taurina, amidas de ácidos grasos; ↑kinurenina, ácido picolínico
hiperamonemia	↓urea, guanidina, arginina, putrescina
hiperlipidemia	↑triglicéridos
metabolismo de lípidos de membrana	fosfolípidos (↑SFA/↓PUFA), ↑ ácidos grasos libres, colina, glicerofosfocolina, diglicéridos, ceramidas; ↓liso-fosfolípidos

Entre estas alteraciones caben destacar los cambios detectados en los niveles de fosfolípidos (PL, *phospholipid*), esfingolípidos (SL, *sphingolipid*) y otros compuestos derivados, los cuales podrían asociarse a un metabolismo anormal de lípidos de membrana. De este modo, la muerte neuronal observada en la EA podría relacionarse con procesos de desestabilización de estas membranas celulares. Uno de los hallazgos más notables fue el cambio observado en la composición de ácidos grasos de distintas especies de fosfolípidos. Al estudiar la composición de estos lípidos de membrana se detectó una disminución significativa de diversas especies formadas por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*), como fosfatidil-colinas, fosfatidil-etanolaminas y plasmalógenos, posiblemente debido a su degradación por estrés oxidativo. Sin embargo, esta degradación selectiva de PUFA-PL se vio acompañada por un aumento paralelo de especies enriquecidas en ácidos grasos saturados (SFA, *saturated fatty acid*) y de cadena corta. Estos resultados fueron posteriormente confirmados mediante la aplicación de una plataforma bidimensional basada en RP-UHPLC-ESI/ICP-MS dirigida al análisis de fosfolípidos en suero (Artículo 6). En primer lugar, el empleo de

ICP-MS permitió la detección específica de hetero-biomoléculas, reduciendo así la complejidad de los perfiles obtenidos. Paralelamente, la identificación de los analitos de interés se realizó mediante la aplicación de espectrometría de masas molecular. Este desbalance en el ratio PUFA/SFA puede causar importantes fallos en las propiedades físico-químicas de las membranas celulares. Por lo tanto, puede concluirse que las anomalías observadas en la composición de los fosfolípidos constituyen un factor clave en los procesos de desestabilización de membrana relacionados con la patología neuronal del Alzheimer.

Además de estos cambios en los niveles de diversas clases de fosfolípidos, la aplicación de DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS evidenció alteraciones en otros metabolitos relacionados con el catabolismo de lípidos de membrana. Los niveles de colina y glicerofosfocolina se encontraron aumentados en pacientes de EA, corroborando una degradación acelerada de fosfatidil-colinas. También se detectó un contenido anómalo de distintos lípidos, subproductos de la degradación de fosfolípidos mediante la acción de fosfolipasas. Así, el aumento de distintos ácidos grasos libres y diglicéridos podría relacionarse con la sobreexpresión de las fosfolipasas A₂ y C/D, respectivamente. Además, los niveles de liso-fosfolípidos (LPL, *lyso-phospholipid*) se encontraron reducidos en estas muestras de suero, lo cual podría ser indicativo de un catabolismo acelerado de estos compuestos. Alternativamente, la acumulación de ceramidas podría asociarse a un proceso de degradación de esfingomielinas, análogo al descrito para los fosfolípidos.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

USING DIRECT INFUSION MASS SPECTROMETRY FOR SERUM METABOLOMICS IN ALZHEIMER'S DISEASE

R. González-Domínguez, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza

Table S1 Demographic characteristics of subjects enrolled in the study

sample ID	diagnosis	age (years)	gender	comorbidities	medication
101	healthy control	70	M	Dyslipidemia	Simvastatin
102	healthy control	69	F	Dyslipidemia Diabetes type II Renal failure Heart failure Hemorrhagic stroke Hepatomegaly Hemiparesis	Linezolid Enoxaparin NTG AAS Diltiazem Fluconazole Furosemide Hydrochlorothiazide Ramipril Clotrimazole Clorazepate Omeprazole
104	healthy control	71	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Paracetamol Calcium
105	healthy control	69	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis Heart failure	Losartan Hydrochlorothiazide Simvastatin Paracetamol Omeprazole
106	healthy control	75	M	Heart failure Sleep apnea	Irbesartan Torsemide Diltiazem Simvastatin AAS Sintrom Plantaben
107	healthy control	68	M	Hypertension	Hydrochlorothiazide
108	healthy control	65	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure Hypothyroidism	Losartan Simvastatin AAS Dronedaron Levothyroxine Indapamide

109	healthy control	70	M	Hypertension Lacunar stroke	Ramipril Clopidogrel Tamsulosin Dutasteride
110	healthy control	70	F	Hypertension COPD Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Tolterodine Alendronate Diltiazem Omeprazole Olmesartan Hydrochlorothiazide Tiotropium Simvastatin AAS
111	healthy control	76	F	Hyperthyroidism Chronic pharyngitis	Gabapentin Lorazepam Risedronate Codeine
112	healthy control	68	F	Anxiety Hiatal hernia Dyslipidemia	Simvastatin Buflomedil Calcium Risedronate Paroxetine Lormetazepam Esomeprazole Chelidon
113	healthy control	70	F	Dyslipidemia Cholecystectomy Hysterectomy	Rosuvastatin
114	healthy control	67	M	Diabetes type II Hyperkalemia Heart failure	Rosuvastatin Clopidogrel Valsartan AAS Furosemide
120	healthy control	67	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Alendronate Calcium Vit.D Simvastatin AAS Candesartan
121	healthy control	67	M	COPD Dyslipidemia Phlebitis (leg)	AAS Simvastatin
123	healthy control	78	M	Heart failure Dyslipidemia	AAS Isosorbide. Amlodipine Atorvastatin

124	healthy control	72	F	Hypertension Dyslipidemia Doudenal ulcer Hiatal hernia	Captopril AAS Simvastatin Esomeprazole Cinitapride Paracetamol
128	healthy control	80	F	Hypertension Dyslipidemia Atrial fibrillation Leukoencephalopathy	Ipratropium Furosemide Olmesartan Sertraline Rosuvastatin Ivabradine Acetylcysteine Calcium Pantoprazole
1	Alzheimer's disease	80	F	Dyslipidemia Arthrosis	Statin Omeprazole Ibuprofen
2	Alzheimer's disease	62	F	Diabetes type II Dyslipidemia	Sulpiride Insulin Metformin Saxagliptin AAS Simvastatin Tramadol Pentoxifylline Lorazepam Citalopram
3	Alzheimer's disease	76	F	Hypertension Diabetes type II Heart failure Osteoporosis Gallstones	Amlodipine Valsartan Atenolol Quinapril AAS Acarbose Esomeprazole
4	Alzheimer's disease	82	F	COPD	AAS
5	Alzheimer's disease	72	M	Hypertension Benign prostatic hyperplasia	
6	Alzheimer's disease	87	M	Diabetes type II Dyslipidemia	Insulin AAS Simvastatin
7	Alzheimer's disease	83	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia	Alprazolam Amitriptyline Medazepam Eprosartan Hydrochlorothiazide

8	Alzheimer's disease	80	M		
9	Alzheimer's disease	76	F	Hypertension Diabetes type II	
10	Alzheimer's disease	80	M		
11	Alzheimer's disease	76	M	Hypertension Arthrosis	Doxazosin Telmisartan Torsemide
12	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Diabetes type II	Calcium Vit. D Ibandronate Metformin Captopril Ranelate Losartan Hydrochlorothiazide Omeprazole
13	Alzheimer's disease	79	F		Midazolam Alprazolam Haloperidol
14	Alzheimer's disease	80	M	DVT	Acenocoumarol
15	Alzheimer's disease	77	F	Hypothyroidism Dyslipidemia Hypotension	Levothyroxine
16	Alzheimer's disease	75	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia	Enalapril AAS Atorvastatin Rosiglitazone Metformin Sitagliptin
17	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Diabetes type II Benign prostatic hyperplasia	Metformin Insulin
18	Alzheimer's disease	80	F	Hypertension Heart failure Hyperthyroidism Mastectomy	Acenocoumarol Paroxetine Telmisartan Hydrochlorothiazide Alprazolam
19	Alzheimer's disease	81	M	Hypertension Cholecystectomy	
20	Alzheimer's disease	83	M	Hypertension Renal failure	Amlodipine Olmesartan Hydrochlorothiazide AAS

21	Alzheimer's disease	81	M	Hypertension Diabetes type II Inguinal hernia	Metformin Enalapril Paracetamol
22	Alzheimer's disease	80	F	Hypertension DVT	Acenocoumarol Oxerutins Metamizol Paracetamol

Table S2 Statistical parameters of PLS-DA models. R^2 : variance explained; Q^2 : variance predicted

model performance	polar extracts		lipophilic extracts		compiled model
	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-	
R^2	0.993	0.991	0.992	0.990	0.999
Q^2	0.760	0.502	0.708	0.537	0.743

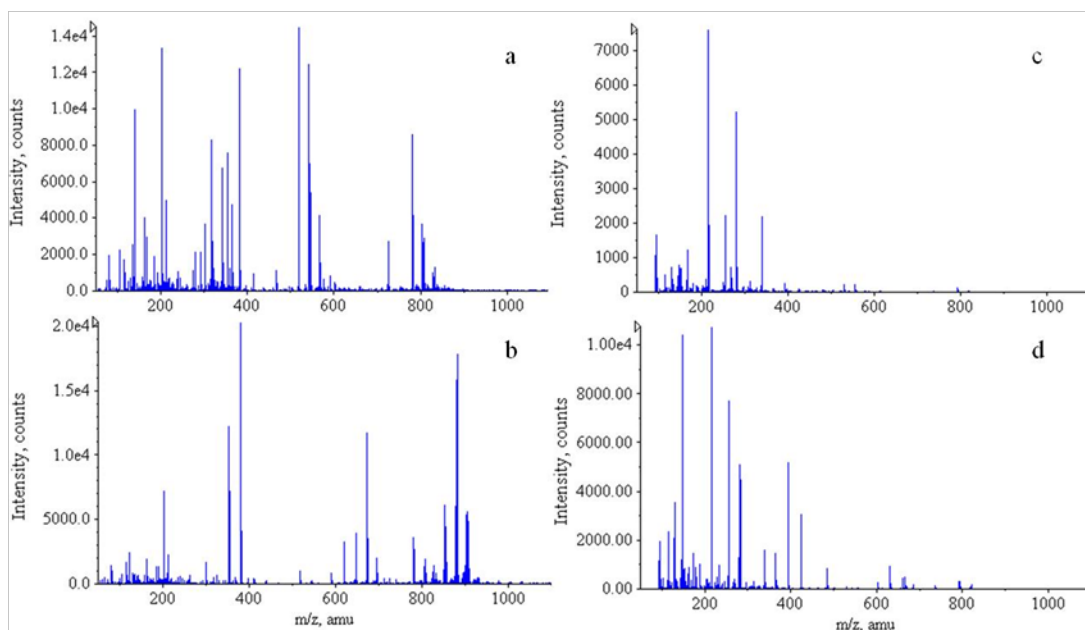


Fig. S1 Mass spectra for ESI+ (a, b) and ESI – data (c, d), with polar (a, c) and lipophilic (b, d) extracts

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

TITLE: APPLICATION OF A NOVEL METABOLOMIC APPROACH BASED ON ATMOSPHERIC PRESSURE PHOTOIONIZATION MASS SPECTROMETRY USING FLOW INJECTION ANALYSIS FOR THE STUDY OF ALZHEIMER'S DISEASE

AUTHORS: Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera*, José Luis Gómez-Ariza*

Department of Chemistry and Materials Sciences, Faculty of Experimental Science,

Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3-UHU)

Research Center of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007-Huelva, SPAIN.

***Corresponding Authors:**

José Luis Gómez Ariza. Tel.: +34 959 219968, fax: +34 959 219942, e-mail address: ariza@uhu.es

Tamara Garcia-Barrera. Tel.: +34 959 219962, fax: +34 959 219942, e-mail address: tamara@dqcm.uhu.es

Supporting Information Table 1. Demographic data of subjects enrolled in the study

sample ID	diagnosis	age (years)	gender	comorbidities	medication	family history (AD cases)
104	healthy control	71	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Paracetamol Calcium	0
106	healthy control	75	M	Heart failure Sleep apnea	Irbesartan Torsemide Diltiazem Simvastatin AAS Sintrom Plantaben	0
111	healthy control	76	F	Hyperthyroidism Chronic pharyngitis	Gabapentin Lorazepam Risedronate Codeine	0
114	healthy control	67	M	Diabetes type II Hyperkalemia Heart failure	Rosuvastatin Clopidogrel Valsartan AAS Furosemide	0

124	healthy control	72	F	Hypertension Dyslipidemia Doudenal ulcer Hiatal hernia	Captopril AAS Simvastatin Esomeprazole Cinitapride Paracetamol	0
125	healthy control	72	F	Hypertension Hypothyroidism Hyperuricemia	Enalapril Simvastatin Levothyroxine Heptaminol Deanol Paroxetine Diazepam Omeprazole	0
126	healthy control	70	M	Hypertension COPD Heart failure Vertiginous syndrome Hiatal hernia	AAS Salmeterol Fluticasone Enalapril Clorazepate Esomeprazole	0
128	healthy control	80	F	Hypertension Dyslipidemia Atrial fibrillation Leukoencephalopathy	Ipratropium Furosemide Olmesartan Sertraline Rosuvastatin Ivabradine Acetylcysteine Calcium Pantoprazole	0
129	healthy control	66	M	Hypertension Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Alfuzosin Telmisartan HCTZ	0
131	healthy control	76	F	Hypertension Dyslipidemia	Enalapril Simvastatin Metamizol Hemovas Esomeprazole	0
132	healthy control	69	F	Hypertension Dyslipidemia Hypothyroidism Glaucoma	Losartan HCTZ Levothyroxine Ibandronate Calcium	0

133	healthy control	79	M	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Ischemic heart failure Hypoacusia Benign prostatic hyperplasia	Gliclazide Olmesartan Atorvastatin AAS Clopidogrel Amlodipine Tamsulosin Zolpidem Furosemide Lorazepam	0
134	healthy control	65	F	Hypertension Diabetes type II Dyspnoea type I	Metformin Glibenclamide Enalapril Timolol Bimatoprost	0
135	healthy control	67	F	Hypertension Dyslipidemia	Simvastatin HCTZ	0
136	healthy control	72	F	Polyarthrosis	Paracetamol	0
137	healthy control	86	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Enalapril Simvastatine Torsemide Ibandronate Omeprazole Paracetamol	0
138	healthy control	71	F		Omeprazole Metamizol	0
139	healthy control	66	F	Diabetes type II Dyslipidemia	Insulin Metformin	0
140	healthy control	66	F	Hypertension Diabetes type I Dyslipidemia Epilepsy Osteoporosis	Insulin Irbesartan AAS Valproate Atorvastatin Fentanyl	0
141	healthy control	75	M	Diabetes type II Osteoarthritis	Metformin Terazosin Omeprazole	1
142	healthy control	70	M	Hypertension Diabetes type II Chronic hepatopathy	Enalapril Simvastatin AAS Metformin Glimepiride	0
143	healthy control	76	F	Dyslipidemia		0

144	healthy control	85	F	Hypertension Anxiety Circulatory failure	Amiloride Pentoxifylline Alprazolam	0
145	healthy control	79	F	Hypertension Dyslipidemia Ischemic heart failure	Telmisartan HCTZ Rosuvastatin Triflusal Diosmin Omeprazole	0
146	healthy control	71	F	Hypertension Diabetes type II Cholecystectomy	Clortalidone Propranolol Pioglitazone Insulin Metformin Sulodexide Loratadine Omeprazole	0
148	healthy control	80	M	Asthmatic bronchitis Dyslipidemia Appendectomy Benign prostatic hyperplasia	Terbutaline Budesonide Simvastatin Alfuzosin Omeprazole	1
149	healthy control	67	M	Hypertension COPD	Enalapril	0
150	healthy control	75	F	Diabetes type II Dyslipidemia Atrophic gastritis	Enalapril Simvastatin Metformin AAS Cilostazol Lansoprazole	0
151	healthy control	79	M	Hypertension Diabetes type II Cataracts	Metformin Valsartan HCTZ	0
152	healthy control	82	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Hysterectomy Spondyloarthritis	Lercanidipine Simvastatin Fentanyl Solifenacin Budesonide Formoterol Metamizol Omeprazole	1
15	Alzheimer's disease	77	F	Hypothyroidism Dyslipidemia Hypotension	Levothyroxine	-

22	Alzheimer's disease	80	F	Hypertension DVT	Acenocoumarol Oxerutins Metamizol Paracetamol	-
23	Alzheimer's disease	78	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure	Olmesartan Amlodipine Pravastatin Acenocoumarol	-
27	Alzheimer's disease	87	F	Diabetes type II	Glicazide Insulin Haloperidol	-
28	Alzheimer's disease	82	M	Dyslipidemia COPD	Atorvastatin Ascorbate	-
29	Alzheimer's disease	67	F	Hypertension	Amlodipine Enalapril Midazolam	-
30	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Dyslipidemia COPD	AAS Atorvastatin	-
32	Alzheimer's disease	86	F	Ocular hypertension Arthrosis	AAS Calcium Timolol Citicoline Simethicone Clebopride Biphosphonate	-
34	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Arthrosis	Metformin AAS Ramipril HCTZ Atenolol Isosorbide Simvastatin Metamizol Famotidine	-
35	Alzheimer's disease	91	M	Hypertension Hyperuricemia Hiatal hernia	Irbesartan Allopurinol Cinitapride	-

36	Alzheimer's disease	78	M	Hypertension Heart failure Renal failure Hypoacusia	Captopril Lercanidipine Furosemide Acenocoumarol Digoxin Paraffin oil Ginkgo biloba Polystyrene sulfonate Trazodone Pantoprazole	-
37	Alzheimer's disease	76	F	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type II Hysterectomy	Losartan HCTZ Allopurinol Amiloride Ramipril Simvastatin Diosmin Metamizol	-
46	Alzheimer's disease	81	M	Hypertension Hepatitis C	Amlodipinoe Valsartan Megestrol	-
47	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Diabetes type I Glaucoma	Tramadol Insulin Losartan HCTZ Desmopressin	-
48	Alzheimer's disease	87	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure	Furosemide Olmesartan Omeprazole	-
49	Alzheimer's disease	77	F	Glaucoma Gonarthrosis	Citalopram Travoprost	-
50	Alzheimer's disease	79	F	Hypertension Diabetes type II	Verapamil Chlorthalidone Metformin Citalopram Omeprazole	-
51	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Dyslipidemia Arthrosis Anxiety	Telmisartan HCTZ Simvastatin Escitalopram Clorazepate Haloperidol Lorazepam Lansoprazole Paracetamol Metamizol	-

52	Alzheimer's disease	79	M	Diabetes type II Genuarthrosis	Glibenclamide Metformin	-
57	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Alfuzosin Verapamil Trandolapril Metformin Chlorthalidone Pentoxifylline AAS Simvastatin Insulin Omeprazole	-
59	Alzheimer's disease	81	F	Hypertension Dyslipidemia	Olmesartan NTG Amiodarone Atorvastatin AAS Citicoline Omeprazole	-
60	Alzheimer's disease	84	F	Hypoacusia	Metamizol	-
62	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type II	Amlodipine Atenolol Insulin Isosorbide Simvastatin AAS Metformin Pentoxifylline Pantoprazole	-
65	Alzheimer's disease	78	M	Dyslipidemia COPD Hypothyroidism Hyperuricemia Benign prostatic hyperplasia	Valsartan Levothyroxine Risperidone Clometiazol Permixon	-
66	Alzheimer's disease	88	M	Heart failure Hypertension Benign prostatic hyperplasia Arthrosis	Propranolol Furosemide Atorvastatin Finasteride AAS Clorazepate Omeprazole	-
67	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Hepatitis C Osteoporosis	Bromazepam Silymarin Diosmin Alendronate	-

68	Alzheimer's disease	82	M	Hypertension Ischemic heart failure Diabetes type II COPD Benign prostatic hyperplasia	Enalapril Simvastatin Atenolol Lercanidipine Tamsulosin Doxazosin AAS Metformin Omeprazole	-
69	Alzheimer's disease	80	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Losartan HCTZ Simvastatin Tramadol Paracetamol Buprenorfine Diclofenac Escitalopram Omeprazole	-
70	Alzheimer's disease	82	F	Bronchial asthma	Salmeterol Fluticasone Montelukast Mirtazapine	-
71	Alzheimer's disease	87	M	Hypertension	Atenolol AAS Omeprazole	-

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SU PROGRESIÓN DESDE EL DETERIORO COGNITIVO LEVE MEDIANTE PLATAFORMAS METABOLÓMICAS BASADAS EN EL ACOPLAMIENTO DE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Artículo 7. Raúl González-Domínguez, Francisco Javier Rupérez, Tamara García-Barrera, Coral Barbas, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic-driven elucidation of pathological mechanisms associated with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* (enviado).

Artículo 8. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal* 107:75-81.

Artículo 9. Raúl González-Domínguez, Antonia García, Tamara García-Barrera, Coral Barbas, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 35:3321-3330.

Capítulo 2

Los artículos relacionados más abajo han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU), enlace a la revista y resumen.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 107, págs. 75-81, (2015). DOI: 10.1016/j.jpba.2014.10.010

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.010>

RESUMEN:

Currently, there is no cure for Alzheimer's disease and early diagnosis is very difficult, since no biomarkers have been established with the necessary reliability and specificity. For the discovery of new biomarkers, the application of omics is emerging, especially metabolomics based on the use of mass spectrometry. In this work, an analytical approach based on direct infusion electrospray mass spectrometry was applied for the first time to blood serum samples in order to elucidate discriminant metabolites. Complementary methodologies of extraction and mass spectrometry analysis were employed for comprehensive metabolic fingerprinting. Finally, the application of multivariate statistical tools allowed us to discriminate Alzheimer patients and healthy controls, and identify some compounds as potential markers of disease. This approach provided a global vision of disease, given that some important metabolic pathways could be studied, such as membrane destabilization processes, oxidative stress, hypometabolism, or neurotransmission alterations. Most remarkable results are the high levels of phospholipids containing saturated fatty acids, respectively, polyunsaturated ones and the high concentration of whole free fatty acids in Alzheimer's serum samples. Thus, these results represent an interesting approximation to understand the pathogenesis of disease and the identification of potential biomarkers.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry". *Electrophoresis*. Vol. 35, n. 23, págs. 3321-3330. DOI: 10.1002/elps.201400196

Enlace al artículo:

<https://dx.doi.org/10.1002/elps.201400196>

RESUMEN:

There is high interest in the discovery of early diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease, for which metabolomics exhibits a great potential. In this work, a metabolomic approach based on ultrafiltration and analysis by CE-MS has been used to obtain representative fingerprints of polar metabolites from serum samples in order to distinguish between patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy controls. By the use of partial least squares discriminant analysis it was possible to classify patients according to the disease stage and then identify potential markers. Significant increase was observed with progression of disease in levels of choline, creatinine, asymmetric dimethyl-arginine, homocysteine-cysteine disulfide, phenylalanyl-phenylalanine, and different medium chain acylcarnitines. On the other hand, asparagine, methionine, histidine, carnitine, acetyl-spermidine, and C5-carnitine were reduced in these serum samples. In this way, multiple essential pathways were found implicated in the underlying pathology, such as oxidative stress or defects in energy metabolism. However, the most interesting results are related to the association of several vascular risk factors with Alzheimer's disease.

En este Capítulo se describe la aplicación de tres plataformas metabolómicas basadas en el acoplamiento de distintas técnicas de separación y posterior detección mediante espectrometría de masas para el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y su progresión desde el deterioro cognitivo leve. Como se ha destacado en la sección de “Introducción”, la elevada complejidad del metaboloma hace necesaria la combinación de múltiples plataformas para obtener una cobertura analítica completa. Por ello, en este estudio se emplearon tres técnicas alternativas con mecanismos de separación complementarios: cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase reversa, cromatografía de gases y electroforesis capilar.

Esta investigación integral de los mecanismos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer se realizó mediante el análisis de muestras de suero sanguíneo de pacientes afectados por EA, DCL y controles sanos haciendo uso de los métodos descritos en la sección 2.1 del apartado “Procedimientos Experimentales”, los cuales se basan en la desproteización del suero y posterior análisis metabolómico mediante UHPLC/GC/CE-MS. El análisis estadístico de los resultados obtenidos reveló diferencias significativas en los niveles de múltiples metabolitos, como se recoge en las tablas incluidas en los artículos anexados. Las alteraciones más notables se encontraron al comparar los perfiles metabólicos observados en pacientes de EA y controles sanos, demostrando la utilidad de la metabolómica en la búsqueda de potenciales biomarcadores de diagnóstico. Sin embargo, la inclusión de pacientes con DCL en estos estudios presenta el interés añadido de permitir la monitorización de los cambios metabólicos asociados a la progresión de la enfermedad de Alzheimer desde etapas pre-clínicas. Así, los cambios detectados en los perfiles metabolómicos de suero de pacientes con DCL respecto a controles sanos podrían asociarse a fallos metabólicos tempranos en el desarrollo de la enfermedad. Por el contrario, la comparación entre pacientes con EA y DCL permite identificar los mecanismos patológicos potencialmente relacionados con el avance de los déficits cognitivos.

El análisis mediante UHPLC-MS reveló alteraciones significativas en los niveles séricos de distintos compuestos lipídicos, incluyendo fosfolípidos, esfingolípidos, monoglicéridos y acil-carnitinas (Artículo 7), demostrando el potencial de esta plataforma metabolómica para el estudio de compuestos de baja polaridad. Alternativamente, el empleo del sistema GC-MS permitió ampliar la cobertura metabolómica hacia metabolitos de bajo peso molecular,

los cuales pueden ser detectados con una elevada sensibilidad y reproducibilidad mediante esta técnica tras su derivatización, evidenciando la implicación de distintos compuestos en el desarrollo de la EA, como ácidos orgánicos o aminoácidos (Artículo 8). Por último, el acoplamiento CE-MS se ha propuesto como una alternativa para investigar el metaboloma polar con un tratamiento mínimo de muestra, sin necesidad de realizar un procedimiento previo de derivatización. Así, la aplicación de esta técnica a las muestras ultrafiltradas de suero de pacientes de EA, DCL y controles sanos permitió detectar alteraciones en los niveles de péptidos, aminoácidos y derivados de la carnitina, entre otros, algunos de los cuales no se han descrito con anterioridad (Artículo 9).

Estas alteraciones confirman los resultados preliminares obtenidos en los *screening* metabólicos realizados mediante DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS (Capítulo 1), los cuales podrían relacionarse con múltiples fallos en distintas rutas metabólicas, permitiendo así la elucidación de posibles mecanismos patológicos subyacentes a la enfermedad de Alzheimer.

❖ **Metabolismo de lípidos de membrana**

Como ya se ha descrito en el Capítulo 1, los fosfolípidos en suero de pacientes afectados por la EA mostraron cambios significativos en su composición de ácidos grasos, con una reducción del contenido total de PUFAs y un aumento paralelo de SFAs. Sin embargo, cabe destacar que el análisis mediante UHPLC-MS permitió corroborar que esta composición anómala de ácidos grasos también se puede observar en los correspondientes productos de degradación, los liso-fosfolípidos. Además, la comparación de los niveles de LPLs en los tres grupos de estudio (*i.e.* EA, DCL, control) hace pensar en una evolución temporal de los mecanismos responsables de la degradación de fosfolípidos ya que, mientras las especies insaturadas de LPLs se encontraron disminuidas en suero tanto de pacientes con EA como DCL, el incremento de SFA-LPLs solo se observó en EA. Por lo tanto, podría concluirse que en este proceso de desestabilización de membranas celulares, el primer paso implica la degradación de PUFA-PL, probablemente como consecuencia del estrés oxidativo, y en segundo lugar su reemplazo por especies saturadas.

La aplicación de estas técnicas metabolómicas también reveló severas deficiencias en los niveles séricos de diversos plasmalógenos, incluyendo tanto plasmenil-etanolaminas (PPE) como plasmenil-colinas (PPC). Sin

embargo, se puede conjeturar que estos procesos patológicos se producen en diferentes etapas de la enfermedad, ya que mientras que los niveles de PPC se encontraron disminuidos en suero tanto de EA como DCL, las muestras de suero de DCL y controles fueron indistinguibles en términos de PPE. Por lo tanto, estos datos sugieren que el metabolismo de PPC se ve alterado en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que los fallos en la homeostasis de PPE deben ocurrir en fases más avanzadas. La reducción de los niveles de estos plasmalógenos podría asociarse a una disfunción peroxisómica, ya que estos lípidos se sintetizan exclusivamente en estos orgánulos celulares. En este sentido, los perfiles de GC-MS mostraron una disminución de ácido pipercolico en suero de EA, un marcador inequívoco de déficits peroxisómicos ya que este metabolito es un producto de degradación de la lisina generado en los peroxisomas cerebrales.

El análisis mediante UHPLC-MS también permitió detectar importantes cambios en el metabolismo de los esfingolípidos. Al igual que la tendencia observada para los fosfolípidos, las esfingomielinas mostraron una composición anómala de ácidos grasos, con un aumento de especies de cadena media y larga (12-18 átomos de carbono), y una disminución de especies insaturadas. Estas alteraciones en la composición de esfingomielinas se vieron acompañadas de una acumulación de ceramidas y esfingosina-1-fosfato, corroborando así una degradación acelerada de esfingolípidos en respuesta a los procesos neurodegenerativos propios de la EA. De forma análoga, se detectó una disminución de sulfatidas y un aumento de lactosil- y hexosil-ceramidas, indicativo de que los procesos catabólicos previamente descritos también afectan de forma significativa al metabolismo de los glucosfingolípidos. Por último, hay que destacar que los cambios observados para la mayoría de estos esfingolípidos fueron más pronunciados en la comparación DCL *vs.* control que en EA *vs.* control, lo cual podría sugerir que las alteraciones en el metabolismo de estos lípidos están principalmente relacionadas con la aparición de mecanismos patológicos tempranos en el desarrollo de la enfermedad.

❖ Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un factor primario en la patogénesis de la EA, el cual ha demostrado jugar un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad desde sus etapas pre-clínicas. Esta situación de estrés puede tener importantes consecuencias metabólicas, induciendo la reducción de los niveles de distintos

antioxidantes y el aumento de múltiples productos de oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En este sentido, el análisis metabolómico de las muestras de suero sanguíneo evidenció la reducción de distintos metabolitos implicados en la protección frente a estrés oxidativo: histidina, imidazol, cistina, ácido piroglutámico y ácido úrico. El ácido úrico es uno de los antioxidantes más comunes en la sangre, por lo que su disminución es habitual en situaciones de estrés oxidativo. De forma análoga, la histidina es un aminoácido con propiedades antioxidantes debido a la presencia de un anillo de imidazol en su estructura, el cual está involucrado en la biosíntesis de otros péptidos antioxidantes como la carnosina o la anserina. La cistina es la forma mayoritaria en la que se encuentra la cisteína en condiciones fisiológicas, que junto con el ácido piroglutámico constituyen algunos de los elementos centrales del ciclo del γ -glutamilo, por el cual se sintetiza otro de los antioxidantes más importantes de los sistemas biológicos, el glutatión. Alternativamente, el análisis mediante DI-ESI-MS (Capítulo 1) también reveló el aumento de distintos eicosanoides (*i.e.* prostaglandinas, leucotrieno B4) junto con la reducción de ácidos grasos poliinsaturados (*i.e.* ácido docosahexaenoico), típicos marcadores de peroxidación lipídica. Además, el aumento de los niveles de adenosina (GC-MS) podría ser indicativo de un catabolismo acelerado de nucleótidos.

❖ **Metabolismo energético**

Las perturbaciones detectadas en los niveles séricos de glucosa, ácido láctico, alanina, carnitina, acil-carnitinas, isocitrato, α -cetoglutarato, malato, asparagina, creatina y creatinina sugieren la presencia de importantes fallos en los mecanismos celulares de obtención de energía, como se esquematiza en la Figura 18. Así, el aumento del contenido de glucosa podría asociarse a una tasa metabólica reducida en EA, mientras que el incremento de lactato y alanina son consistentes con un cambio en el metabolismo energético hacia la glucólisis anaeróbica. Por el contrario, la disminución de los niveles de carnitina libre y el aumento de distintas acil-carnitinas de cadena media y larga (C8-C18) son indicativos de un metabolismo incompleto de lípidos mediante β -oxidación. Diversos intermedios del ciclo de Krebs y compuestos relacionados también se vieron alterados en muestras de EA y/o DCL (*i.e.* isocitrato, α -cetoglutarato, malato, asparagina), evidenciando importantes fallos mitocondriales. Por último, la disminución de los niveles de creatina y el aumento de creatinina corrobora esta situación hipometabólica, ya que

ambos metabolitos están implicados en la bioenergética celular a través del sistema ATP-creatina.

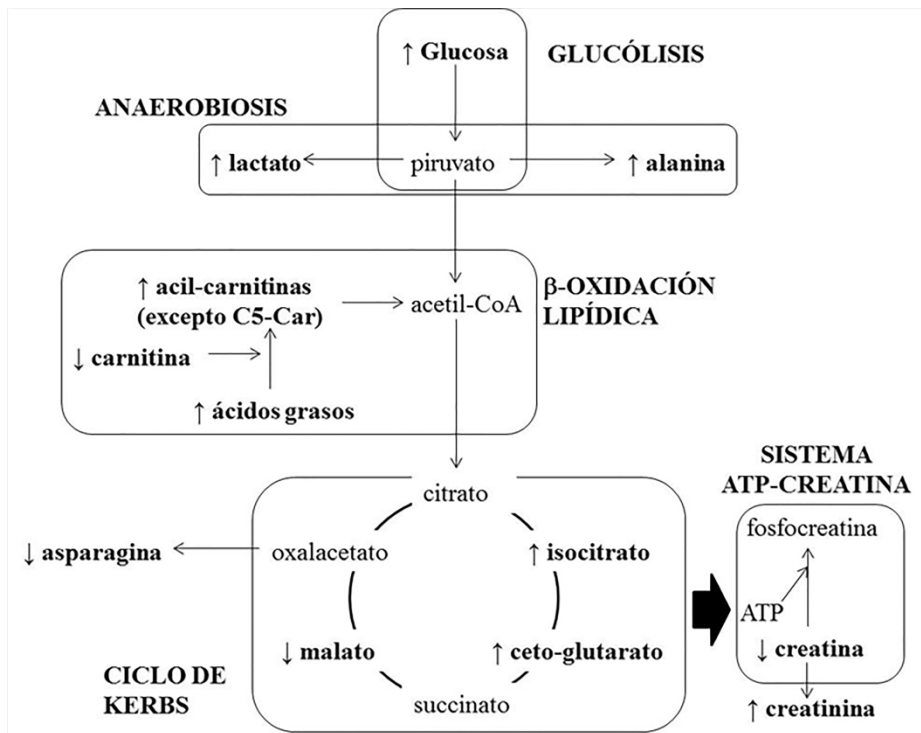


Figura 18. Alteraciones metabólicas relacionadas con el metabolismo bioenergético.

❖ Sistemas neurotransmisores

La aplicación de las técnicas metabólicas permitió detectar anomalías en las rutas de síntesis de numerosos compuestos neurotransmisores, las cuales podrían estar involucradas en los fallos sinápticos conducentes a los procesos neurodegenerativos propios de esta enfermedad. En este sentido, se encontraron niveles disminuidos de dos neurotransmisores monoaminérgicos fundamentales en el funcionamiento cerebral, como son la dopamina y la serotonina. Además, estas alteraciones se vieron acompañadas por la reducción de distintos aminoácidos aromáticos (*i.e.* triptófano, tirosina, fenilalanina), precursores de estos neurotransmisores. En relación al metabolismo del triptófano, también se observó un aumento de otros compuestos neuroactivos como la kinurenina y el ácido picolínico, indicativo de la sobreexpresión de la ruta de la kinurenina. Complementariamente, la reducción de los niveles de glutamato y otros metabolitos relacionados, como

glutamina y N-acetil-glutamina, también sugiere fallos en la neurotransmisión glutamatérgica. Otros metabolitos implicados en sistemas de neurotransmisión que se encontraron disminuidos en suero de EA/DCL fueron el ácido aspártico, el sulfato de pregnenolona y la taurina. Por último, la disminución del contenido sérico de distintos monoglicéridos y amidas de ácidos grasos podría asociarse a perturbaciones en el sistema endocanabinoide, el cual está implicado en diversos procesos de neurotransmisión y neuromodulación.

❖ **Otros mecanismos patológicos**

La disminución de los niveles de urea, guanidina, arginina, ornitina, putrescina y N-acetil-espermidina en suero de pacientes afectados por la EA sugiere alteraciones en el ciclo de la urea-guanidina y otras rutas relacionadas como el metabolismo de las poliaminas. Estas rutas son responsables del control de los niveles de amonio en el organismo, por lo que las perturbaciones metabólicas detectadas podrían estar relacionadas con una situación de hiperamonemia.

Además, otros metabolitos permitieron relacionar la patología de la EA con diversos factores de riesgo vascular, como la hiperlipidemia (acumulación de triglicéridos y colesterol), inhibición de la óxido nítrico sintetasa (acumulación de dimetilarginina asimétrica), hiperhomocisteinemia (acumulación de homocisteína y disminución de metionina) y desregulación del sistema renina-angiotensina (aumento del péptido di-fenilalanina).

Por último, el análisis mediante CE-MS también reveló alteraciones en los niveles séricos de múltiples péptidos de cadena corta, lo cual podría asociarse a un metabolismo proteolítico anormal debido a fallos en los mecanismos de síntesis y degradación de proteínas.

Current Alzheimer Research



METABOLOMIC-DRIVEN ELUCIDATION OF PATHOLOGICAL MECHANISMS ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND MILD COGNITIVE IMPAIRMENT



Journal:	<i>Current Alzheimer Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gonzalez-Dominguez, Raul; University of Huelva, Ruperez, Javier; University San Pablo CEU, Garcia-Barrera, Tamara; University of Huelva, Barbas, Coral; University San Pablo-CEU, Gomez-Ariza, Jose Luis; University of Huelva, Chemistry
Keywords:	Alzheimer's disease, disease progression, membrane breakdown, mild cognitive impairment, pathological mechanisms, early diagnosis



**METABOLOMIC-DRIVEN ELUCIDATION OF PATHOLOGICAL MECHANISMS
ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND MILD COGNITIVE IMPAIRMENT**

Raúl González-Domínguez^{a,b,c}, Francisco Javier Rupérez^d, Tamara García-Barrera^{a,b,c}, Coral Barbas^d, José Luis Gómez-Ariza^{a,b,c}

^aDepartment of Chemistry and CC.MM. Faculty of Experimental Science. University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007 Huelva. SPAIN; ^bCampus of Excellence International ceiA3. University of Huelva. SPAIN; ^cResearch Center of Health and Environment (CYSMA). University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007 Huelva. SPAIN; ^dCenter for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO), Pharmacy Faculty, Campus Montepriincipe, Universidad San Pablo-CEU, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, SPAIN

Corresponding author: José Luis Gómez Ariza, Department of Chemistry and CC.MM. Faculty of Experimental Science. University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007 Huelva. Spain. Tel: +34959219968, fax: +34 959 219942, e-mail address: ariza@uhu.es

Running title: Metabolomic study of Alzheimer's disease progression

ABSTRACT

Numerous efforts have been made in the last years to discover potential biomarkers of Alzheimer's disease and its progression from mild cognitive impairment, considered as a transition phase between normal aging and Alzheimer. However, there is still a considerable lack of understanding about pathological mechanisms underlying to disease. In the present study, serum metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry was applied to investigate metabolic differences between patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and healthy controls. The most important findings could be related to impaired metabolism of phospholipids and sphingolipids leading to membrane breakdown, wherein the nature of the fatty acids contained in the structure in terms of acyl chain length and degree of unsaturation appears to play a crucial role. Furthermore, several discriminant metabolites were found for the first time in relation to known pathological processes associated with Alzheimer's disease, such as the accumulation of acylcarnitines in relation to mitochondrial dysfunction, decreased levels of oleamide and monoglycerides as a result of defects in endocannabinoid system, or increased serum phenylacetylglutamine, which could reveal alterations in glutamine homeostasis. Therefore, these results represent a suitable approximation to understand the pathogenesis and progression of the disease.

KEYWORDS. Alzheimer's disease, disease progression, membrane breakdown, metabolomics, mild cognitive impairment, pathological mechanisms

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder among older people, with a complex etiology in which multiple pathological processes are involved. A great challenge in AD research is early diagnosis, given that currently it can be only detected at advanced stages of disease by exclusion of other pathologies based on clinical criteria defined by the NINCDS-ADRDA [1]. To this end, new diagnostic tools are required for predicting the development of dementia from older people with very mild symptoms of cognitive dysfunction. This pre-dementia phase, known as mild cognitive impairment (MCI), is considered as a transition stage between normal aging and Alzheimer. However, MCI is a heterogeneous syndrome with several possible outcomes, so that although up to 80% of patients develop AD, others have a benign form of MCI as part of the normal aging process [2]. Thus, numerous efforts have been made to discover biomarkers of Alzheimer and its progression, in order to differentiate between AD, MCI and healthy control subjects. Conventional markers of AD such as cerebrospinal fluid levels of A β peptides and tau protein have proven useful in the study of MCI [3], and different neuroimaging techniques have been also extensively applied for detection of brain abnormalities in AD and MCI patients [4]. Alternatively, it is recognized that metabolomics plays nowadays an important role in health survey and biomarkers discovery, because changes in specific groups of metabolites may be sensitive to pathogenically relevant factors. Furthermore, the non-targeted character of this approach allows a broader investigation of disease and better understanding of underlying pathological mechanisms. In this way, several authors have previously described the use of metabolite profiling for monitoring progression of AD from MCI. On the one hand, it has been demonstrated the occurrence of early metabolic changes associated with the onset of dementia in MCI patients compared to age-matched controls. ¹H NMR spectroscopy of serum samples underlined the association between MCI and altered lipid metabolism, particularly with low relative amount of ω 3 fatty acids and metabolic syndrome [5]. Moreover, Zheng *et al.* developed a metabolomic approach based on liquid chromatography-mass spectrometry combined with an isotope dansylation labeling method for quantitative profiling of the human salivary metabolome, whose application to MCI patients revealed the implication of taurine in its pathogenesis [6]. On the other hand, other authors focused on determining altered profiles associated with the progression of dementia by means of comparative studies between MCI and AD patients. Greenberg *et al.* found a considerable increase of three bile acids in serum from AD and MCI patients [7], while in other prospective cohort study AD patients presented diminished levels of different classes of lipids, and 2,4-dihydroxybutanoic acid, dipalmitoyl-phosphatidylcholine and an unidentified organic acid were found as predictive markers of progression to AD in the follow-up [8]. More recently, Wang *et al.* described two biomarker panels consisting in several plasma metabolites to discriminate AD and MCI patients from normal controls [9], and metabolomic analysis of serum samples by capillary electrophoresis also revealed the involvement of numerous polar compounds [10]. Alternatively, different analytical platforms have been also applied to examine metabolic differences in CSF samples from subjects with different cognitive status related to AD advance, including capillary electrophoresis-mass spectrometry [11], ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [12] and liquid chromatography-electrochemical coulometric array detection [13]. Finally, integrated analysis of both plasma and CSF has allowed to evaluate in a more comprehensive manner the early disease mechanisms shared in progression from normal aging to MCI and AD, so that numerous canonical pathways were found significantly disturbed [14]. Nevertheless, despite the considerable amount of literature on this subject, there is still a considerable lack of understanding about pathological mechanisms underlying to this neurodegenerative disorder.

In this work we present a metabolomic study of Alzheimer's disease pathogenesis and its progression from mild cognitive impairment in serum samples. For this, a large population sample has been enrolled, comprising AD and MCI patients, and aged-control subjects (n=137). Metabolomic screening of serum samples was performed by ultra-high performance liquid chromatography-MS, which has become the main workhorse in this field due to its high resolution and sensitivity, fast analysis and good potential for biomarker identification [15]. Thus, numerous compounds were identified as potential markers of AD and MCI, which may contribute to deepen into underlying pathological mechanisms related to neurodegenerative processes.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. CHEMICALS

Methanol, ethanol, acetonitrile (HPLC-grade) and formic acid (MS-grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and water was purified with a Milli-Q Plus 185 system (Millipore, Bedford, USA). Purine and HP921 (standard reference solutions) were obtained from Agilent Technologies (USA).

2.2. BLOOD COLLECTION

Blood samples were collected from 137 subjects recruited by the Neurological Service of Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva, Spain), including healthy controls (HC), mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD) patients. Blood was obtained by venipuncture of the antecubital region after 8 hours of fasting and collected in BD Vacutainer SST II tubes with gel separator and Advance vacuum system, previously cooled in a refrigerator. Samples were immediately cooled and protected from light for 30 minutes to allow clot retraction, and then centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes. Serum was aliquoted in Eppendorf tubes and frozen at -80°C until analysis. Alzheimer's disease patients ($n=75$, 33 male and 42 female, medium age 79.9 ± 5.0 y) were newly diagnosed of sporadic AD according to the criteria of the NINCDS-ADRDA [1], and only subjects that had not yet received any type of medication were included in the study. Mild cognitive impairment patients ($n=17$, 10 male and 7 female, medium age 76.1 ± 5.5 y) reported cognitive decline and impairment on objective cognitive tasks, but they were not demented and did not meet the NINCDS-ADRDA requirements for a possible or probable diagnosis of Alzheimer [2]. Finally, matched healthy controls in sex and age ($n=45$, 18 male and 27 female, medium age 72.4 ± 5.5 y) were enrolled after examination by neurologists to confirm the absence of neurological disorders, whom had not more than two reported cases of Alzheimer's disease in their families. All subjects gave informed consent for the extraction of peripheral venous blood, and the study was performed in accordance with the principles contained in the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee of University of Huelva.

2.3. METABOLOMIC FINGERPRINTING

Metabolomic analysis of serum samples was performed following a procedure previously optimized [16]. For protein precipitation and metabolite extraction, $50\mu\text{L}$ of serum were mixed with $150\mu\text{L}$ of a cold mixture of methanol:ethanol (1:1). Then, samples were briefly vortexed and maintained for 5 min in an ice bath. Finally, protein precipitate was removed by centrifugation at 13000 rpm for 20 min at 4°C , and the supernatant was filtered through a $0.22\mu\text{m}$ nylon filter. Samples were subsequently fingerprinted by ultra-high performance liquid chromatography (Agilent 1290) coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometry system equipped with electrospray source (Agilent 6550). Separation was performed in a reversed-phase column (Zorbax Extend C18, 2.1×50 mm, $1.8\mu\text{m}$) thermostated at 60°C , with an injection volume of $0.5\mu\text{L}$. Solvents were delivered at a flow rate 0.6 mL/min , using water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B). The gradient program was as follows: initial conditions were 5% B for 1 min, followed by a gradual increase to 80% B in 6 min and finally 100% B in other 4.5 min. Then, system returns to initial conditions in 0.5 min, and column is equilibrated for 1 min with 5% B. Therefore, total analysis time was 15 min. MS operated in positive and negative polarities in separated runs, acquiring full scan spectra in the m/z range 50-1000. The capillary voltage was set to 3000 V, with 1000 V of nozzle voltage, 175 V of fragmentor voltage and 65 V of skimmer voltage. Nitrogen was used as drying and nebulizer gas, whose temperature was fixed at 250°C . Drying gas was supplied at 12 L/min , while nebulizer gas pressure was 52 psi.

2.4. DATA PROCESSING

The raw data was preprocessed by the Molecular Feature Extraction (MFE) tool in MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies) for cleaning background noise and unrelated ions. The MFE algorithm uses the accuracy of the measurements for grouping related ions by charge state envelope, isotopic distribution, and/or the presence of adducts and dimmers, and then creates a list of all possible components (or features) described by mass, retention time and abundance [17]. Thus, processing was performed by applying an abundance cutoff of 200 counts and enabling the search of different ion species ($\text{M}+\text{H}^+$, $\text{M}+\text{Na}^+$, $\text{M}+\text{K}^+$, $\text{M}+\text{NH}_4^+$, $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ in positive mode; $\text{M}-\text{H}^-$, $\text{M}+\text{HCOO}^-$, $\text{M}+\text{Cl}^-$ in negative mode). In addition, for isotope grouping, the peak spacing tolerance was set at 0.0025 m/z , and the charge states were limited to 2. Then, alignment and filtering were conducted using the Mass Profiler Professional software (Agilent Technologies). For this, data was filtered by selecting features into the range 0.05-11.5 min, and then, peaks were aligned applying a retention time window of 0.15 minutes and a mass window of 20 ppm.

2.5. DATA ANALYSIS

First of all, data was filtered in Mass Profiler Professional to remove non reproducible signals before to perform any statistical analysis. Features were filtered by choosing masses present in at least 75% of samples in one of the compared groups, and then features were again filtered on sample variability, selecting only variables with a coefficient of variation less than 50% within each group. Then, data were processed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in SIMCA-PTTM software (version 11.5,

Umetrics AB, Umeå, Sweden), in order to find differences between the groups of study. For this, data was submitted to Pareto scaling, for reducing the relative importance of larger values, and logarithmic transformation, in order to approximate a normal distribution [18]. In addition, quality of the model was assessed by the R^2 and Q^2 values, supplied by the software, which provide information about the class separation and predictive power of the model, respectively. These parameters are ranged between 0 and 1, and they indicate the variance explained by the model for all the data analyzed (R^2) and this variance in a test set by cross-validation (Q^2). Finally, potential biomarkers of disease and its progression were found by two-class comparisons, AD vs. HC, MCI vs. HC (markers of advanced and early dementia, respectively), and AD vs. MCI (markers of dementia progression). For this purpose, univariate statistical analyses (t-test, $p \leq 0.05$) were performed, and loadings plots from PLS-DA were inspected to select altered metabolites according to the Variable Importance in the Projection, or VIP (a weighted sum of squares of the PLS weight, which indicates the importance of the variable in the model), considering only variables with VIP values higher than 2, indicative of significant differences among groups.

2.6. IDENTIFICATION OF METABOLITES

Identification of significant compounds was made matching the experimental accurate mass and tandem mass spectra (MS/MS) with those available in metabolomic databases (HMDB, METLIN, KEGG and LIPIDMAPS), using a mass accuracy of 20 ppm. In addition, the identity of lipids was confirmed based on characteristic fragmentation patterns described in literature. Phospholipids presented characteristic fragments in positive ionization mode of 184, 104, and 86 m/z for phosphatidylcholines (PCs) and lyso-phosphatidylcholines (lysoPCs), and $[M+H-141]^+$ for phosphatidylethanolamines (PEs) and lyso-phosphatidylethanolamines (lysoPEs), while in negative mode these distinctive signals are found at 168 and 196, respectively. Furthermore, fragmentation in the glycerol backbone by losses of the fatty acyl substituents enables the identification of individual species of phospholipids [19]. For sphingolipids, typical product ions appear at m/z 264 and 282 due to the fragmentation in the sphingosine moiety, and in the particular case of sphingomyelins, cleavage of phosphocholine headgroup generates characteristic fragments of 184 and 168 m/z, in positive and negative modes respectively [20]. Finally, acylcarnitines were confirmed based on characteristic fragments of 60 and 85 m/z [21].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. METABOLITE FINGERPRINTING FOR SAMPLES CLASSIFICATION

Metabolomic fingerprints obtained from serum samples in both positive and negative ionization modes (Fig. 1) were submitted to multivariate statistical analysis to check the potential of the methodology to discriminate between AD, MCI and healthy control subjects. For data collected in positive polarity, a PLS-DA model was built showing clear classification of the three groups under investigation (Fig. 2A), whose quality was appropriated in terms of variance explained ($R^2=0.84$) and variance predicted ($Q^2=0.263$). On the other hand, negative data provided worse statistical models ($R^2=0.844$, $Q^2=0.032$), which leads to less robust separation between the three groups (Fig. 2B). Finally, to obtain more detailed information about the variables involved in discrimination according the stage of dementia, groups were compared by pairs: AD vs. HC, MCI vs. HC and AD vs. MCI. Scores plots demonstrated a total separation between the different groups (Fig. 2C-E), but quality parameters were again lower for statistical models built with data collected in negative mode.

3.2. SELECTION OF POTENTIAL BIOMARKERS

Statistically significant compounds identified are summarized in Tables 1-3, including their retention times and experimental accurate masses, the mass error, the ionization mode used for detection, the percentage of change observed in each comparison and the p-value. All these metabolites were significantly altered in AD patients respect to healthy controls ($p \leq 0.05$), but in addition, some of them were also perturbed in MCI. Thus, changes in the comparison MCI/HC could be considered as precursors in the early development of neurodegenerative failures, while altered metabolites between AD and MCI patients would be related to progressive changes along the advance of cognitive dysfunction. Furthermore, column plots representing the mean values with standard deviation bars for these selected metabolites showed that inter-individual variability within each group is less important than differences between groups (Fig. 3), thus corroborating that metabolic alterations detected can be attributed to disease state, as previously demonstrated [22].

3.3. BIOLOGICAL MEANING

In this study, numerous metabolites were found significantly altered in serum from AD and MCI patients, which show the deep impact that this disorder causes on multiple essential pathways in the organism. One of the most important changes was observed in phospholipids and related compounds, listed in Table 1.

Alzheimer's disease has been traditionally associated with abnormal metabolism of brain phospholipids leading to the breakdown of cellular membranes, principally due to the over-activation of phospholipases [23], but it can be also related to changes in the fatty acid composition of these lipids. Thereby, the loss of unsaturated fatty acids due to oxidative stress, such as docosahexaenoic and araquidonic acid that are highly enriched in neurons, seems to contribute to AD pathogenesis *via* membrane damage, in line with previous studies reporting reduced levels of phospholipids containing PUFAs in brain and blood of patients with Alzheimer's disease [24-25]. On the other hand, saturated fatty acids (SFA) have received much less attention, and most authors found no differences in their distribution among phospholipids. Nevertheless, Söderberg *et al.* showed that the decrease in PUFA-containing phosphatidylethanolamines in AD brain is paralleled by an increase in the relative amounts of the saturated components 14:0, 16:0 and 18:0 [26], and more recently, it has been demonstrated that these imbalances in the ratio saturated/polyunsaturated fatty acids are also present in serum phosphatidylcholines [19,27]. In the present work, this rationale was corroborated by increased levels of SFA-containing phosphocholines and phosphoethanolamines, together with a significant decrease in several unsaturated phosphocholines, containing linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid (Table 1). Moreover, several plasmalogen species were also down-regulated during the development of Alzheimer. Previous studies have shown that ethanolamine plasmalogen deficiency is closely related to AD [24], but also plasmenylcholines appear to be involved in neurodegenerative processes [27]. However, based on our experimental results, we can conclude that these pathological processes occur at different stages of the disease, which has not been previously described to our knowledge. Choline plasmalogen levels were significantly decreased in serum from AD and MCI patients compared to healthy controls, which supports that its metabolism is triggered in the onset of neurodegeneration. On the other hand, MCI and healthy controls were indistinguishable in terms of ethanolamine plasmalogenes, indicating that this impairment must occur at more advanced stages of disease. Besides the already described changes in serum levels of phospholipids, lyso-phospholipids were also involved in pathogenesis of AD. In previous studies, total lyso-phosphocholines concentration tended to be lower in blood of AD patients [19,28], reflecting alterations in the metabolism of choline-containing phospholipids that may be attributed to impairments in the deacylation-reacylation cycle of phospholipids. However, it is noteworthy that lyso-phospholipids presented a similar distribution to that of their precursors in our analysis, with increased levels of saturated compounds respect to unsaturated ones in both ethanolamine and choline species (Table 1). Therefore, it can be concluded that the imbalance observed in phospholipids is finally reflected in their degradation products, which makes them useful markers of destabilization of neuronal membranes. Furthermore, the comparison of the three study groups lead us to believe in a temporal evolution of the processes leading to phospholipids degradation given that, while unsaturated lysophospholipids are down-expressed in both AD and MCI patients, the increase of saturated species is only observed in AD. Thus, it could be hypothesized that, in the membrane destabilization process, the first step supposes the degradation of PUFA-containing phospholipids (probably due to oxidative stress), and secondly, their replacement by saturated ones. Among these lysophospholipids, one deserves special attention: LPC(O-18:0), an alkyl ether lysophospholipid involved in the synthesis of platelet activating factor (PAF) by the remodeling pathway. In this context, Ryan *et al.* found three PAF species significantly elevated in AD cortex: C16:0 PAF, its precursor C16:0 lyso-PAF, and C18:1 lyso-PAF [29]. Thus, the increase observed in serum C18:0 lyso-PAF (Table 1) could reveal a selective disruption of stearoyl-PAF biosynthesis, complementary to findings by Ryan *et al.*, which evidences that these impairments in lipid metabolism are finally reflected in peripheral fluids.

The involvement of perturbed sphingolipid metabolism also emerges as a pivotal event in membrane degeneration in AD, as can be observed in Table 2. Defects in sphingolipid metabolism have been previously associated with Alzheimer's disease, with up-regulated activities of different enzymes such as ceramide synthases [30] and acid sphingomyelinase [31], which suggests a shift in metabolism towards the accumulation of ceramides. In this sense, high levels of total ceramides have been previously found in brain [30-32] and blood [33-34] of AD patients, which is in agreement with our findings in serum (Table 2). On the other hand, studies of sphingomyelin (SM) levels in AD are less clear. Results from post-mortem brain analyses are contradictory, showing increased [35] or decreased [31] total concentrations of SMs, while plasma levels appear to be decreased [30]. The reasons for these discrepancies are not understood to date, but they could be related to differences in the acyl chain composition. It has been demonstrated that the increase of ceramides in AD brain is more pronounced for species containing very long chain fatty acids [36], which is consequent with the elevated expression of long-chain ceramide synthase [30]. Similarly, when individual SM species are considered, most authors noted a decrease in very long chain sphingomyelins [33,36], while other species are usually over-expressed [35]. In this work, this hypothesis was corroborated by the increased serum levels of several medium- and long-chain

sphingomyelins (MCFA-SM and LCFA-SM) in AD and MCI patients, from 12 to 18 carbon atoms (Table 2), while very long chain species remained unchanged. Alternatively, levels of one sphingomyelin that presents an n-6 fatty acid in its structure, SM(d18:1/18:2), were decreased in diseased subjects, suggesting a possible implication of oxidative stress in its degradation, as occurred with analogous phospholipids (Table 1). Furthermore, besides the described differences according the fatty acid contained in the structure, it is remarkable the trend observed in sphingomyelin levels between the three groups of study. For most of these compounds, the percentage of change was slightly more pronounced in the comparison MCI vs. HC than in AD vs. HC, which suggests that alterations in the SM metabolism may principally contribute to early pathological processes. In this sense, Kosicek *et al.* found significantly increased SM levels in the CSF from individuals with prodromal AD compared to cognitively normal controls, mild and moderate AD [37], and Mielke *et al.* have demonstrated that blood sphingomyelins and ceramides vary according to the timing of the onset of memory impairment [38]. Therefore, peripheral levels of these sphingolipids could be good pre-clinical predictors of memory impairment and markers of progression. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a signaling molecule produced via degradation of ceramides by the enzyme ceramidase and subsequent phosphorylation by sphingosine kinase. Previous studies reported that acid ceramidase is up-regulated in AD brains versus normal controls [31], as well as the activity of sphingosine kinase 2 [39], which supports the increased levels of S1P found in serum samples (Table 2). Finally, changes in hexosylceramides, lactosylceramides and sulfatides (Table 2) also support the involvement of glycosphingolipids in pathogenesis of AD. On the one hand, a substantial reduction of sulfatide levels was observed in serum samples from AD patients, as previously reported in brain [29]. On the other hand, the increase of different species of lactosylceramides (Table 2) could be indicative of an impaired metabolism of gangliosides. Like sulfatides, earlier studies in AD showed alterations of ganglioside metabolism resulting in reduced levels in the majority of brain regions [40], but increased serum lactosylceramide has been associated with risk of AD only once [41]. Complementarily, hexosylceramides, which comprise both isomeric glucosyl and galactosyl species indistinguishable by MS, were also increased in serum samples. Glucosyl- and galactosyl-ceramides are potential degradation products of glycosphingolipids, so their over-expression support the depletion observed in gangliosides and sulfatides, respectively. Finally, it should be pointed out that the increase of hexosyl- and lactosyl-ceramides was sharper in MCI than in AD, which suggests that depletion of glycosphingolipids occurs in the onset of disease, as previously mentioned for sphingomyelins. Therefore, it can be concluded that cellular membrane must be a primary target in pathogenesis of Alzheimer's disease. Abnormal metabolism of different phospholipids and sphingolipids was observed during the progression of disease, which results in important biochemical changes in serum samples (Tables 1 and 2). Thus, membrane breakdown can be considered as a source of potential markers of Alzheimer, as summarized in Figure 4.

Aside from changes related to membrane defects, the decrease observed in monoglycerides (monopalmitin and monostearin) and oleamide (Table 3) could point to disturbances in endocannabinoid (EC) system. This system plays a role in a variety of physiological processes, mainly in the central nervous system where acts as neuromodulator. However, accumulating data show an imbalance in key elements of the EC system associated with AD and other neurodegenerative disorders. In this sense, the expression levels of cannabinoid receptors (CB) have been found altered in AD brains, including a decrease of CB1 receptors and a complementary up-regulation of CB2 receptors in the hippocampus [42]. In addition, the activities of enzymes fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL), which are involved in the metabolism of the major endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (AG) respectively, are affected in AD. Benito *et al.* reported that the activity of FAAH seems to be elevated in the plaques and surrounding areas of AD brains [42], which could be responsible for the decrease of oleamide found in serum of AD and MCI patients. Oleamide is a bioactive fatty acid amide catabolically related to AEA, which may be also degraded by FAAH thereby serving as indicator of its over-expression. On the other hand, there is also evidence for the involvement of monoglyceride lipase in AD, given that it has been found that microglia expressing MAGL accumulates around senile plaques [43]. This lipase is the major enzyme inactivating 2-arachidonoyl glycerol, but other monoglycerides are also potential substrates. In this way, reductions of circulating levels of monopalmitin and monostearin could be considered as indicators of MAGL over-expression.

Long chain acylcarnitines were also increased in serum of AD and MCI patients, which may indicate an incomplete fatty acid β -oxidation in the onset of disease. Elevation of palmitoyl-, stearoyl-, oleyl- and linoleyl-carnitines is the characteristic feature of carnitine palmitoyltransferase II deficiency, an inherited metabolic impairment that prevents mitochondrial oxidation of long chain fatty acids [44]. In this sense, mitochondrial dysfunction appears to be one of the primary events in the course of AD, which can perturb cellular bioenergetics [45]. Therefore, this impaired metabolism of lipids could be involved in

neurodegenerative energetic failures as a supplementary pathway to those previously described, such as deregulated tricarboxylic acid cycle or oxidative phosphorylation system [46].

Histidine is an amino acid with antioxidant and anti-inflammatory properties, like other imidazole-containing compounds. Thus, oxidative stress may account for the decrease of this amino acid (Table 3), as previously reported [24,27]. Pregnenolone sulfate (PREGS) is a neurosteroid precursor of estrogens, progestins and androgens, which plays important roles in the aging nervous system. Weill-Engerer et al. found a general trend toward lower levels of PREGS and other steroids in brain of AD patients, and a negative correlation between PREGS and β amyloid levels [47]. In the present study, pregnenolone sulfate was decreased in serum samples from AD patients compared to MCI and controls, corroborating the potential of neurosteroids as diagnostic markers of Alzheimer. Finally, increased serum levels of phenylacetylglutamine (PAG) were found in AD and MCI patients, which could be associated with elevated levels of glutamine, given that PAG can be also synthesized in the liver by condensation of glutamine with phenylacetyl-CoA. Therefore, the increase observed in PAG could be considered a novel marker of impaired glutamate-glutamine homeostasis in relation to the regulation of ammonia levels in the organism [48].

4. CONCLUSIONS

Metabolomic fingerprinting of serum samples by UHPLC-ESI-QTOFMS has been demonstrated as a suitable approach to distinguish between patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and healthy controls. Multiple metabolites, principally lipids, were identified as potential markers for diagnosis, which indicated the involvement of different pathological processes in the development of neurodegeneration. Thus, it was observed a deep dysregulation in metabolism of phospholipids and sphingolipids in terms of altered levels of saturated/unsaturated fatty acids contained in the structure, but also due to differences in the acyl chain length. In addition, these imbalances were accompanied by significant changes in related compounds (ceramides, lyso-phospholipids) that pointed to membrane breakdown. On the other hand, novel potential biomarkers not previously described were found for well-known pathological situations associated with AD: defects in energy metabolism (long chain acylcarnitines) and endocannabinoid dysfunction (monoglycerides and oleamide). Finally, reductions in histidine and PREGS were related to oxidative stress and altered neurosteroid metabolism, respectively, while increase of PAG could reveal impaired glutamine homeostasis in pathogenesis of AD. Furthermore, the comparative study between AD and MCI patients allowed exploring these altered pathways in more detail for better understanding of pathogenesis and progression of disease from pre-clinical stages of dementia.

Abbreviations. AD: Alzheimer's disease; MCI: mild cognitive impairment; HC: healthy control; UHPLC-MS: ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry; PLS-DA: partial least squares discriminant analysis; VIP: variable importance in the projection; LPE: lyso-phosphoethanolamine; LPC: lyso-phosphocholine; PE: phosphoethanolamine; PC: phosphocholine; PPC: choline-plasmalogen; PPE: ethanolamine-plasmalogen; SIP: sphingosine-1-phosphate; CER: ceramide; SM: sphingomyelin; Hex-CER: hexosyl-ceramide; SULF: sulfatide; Lac-CER: lactosyl-ceramide; MG: monoglyceride; CAR: carnitine; PAG: phenyl-acetyl-glutamine; PREGS: pregnenolone sulfate; PUFA: polyunsaturated fatty acid; SFA: saturated fatty acid

Acknowledgements. This work was supported by the projects CTM2012-38720-C03-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and P008 FQM-3554 and P009-FQM-4659 from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). Raúl González Domínguez thanks the Ministerio de Educación for a predoctoral scholarship. The authors also thank to Dr. Alberto Blanco and Carlos Salgado from Hospital Juan Ramon Jimenez for providing serum samples.

REFERENCES

- [1] McKahn G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-44 (1984).
- [2] Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256: 183-94 (2004).
- [3] Dean RA, Shaw LM. Use of cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Clin Chem* 56: 17-9 (2000).
- [4] Reiman ER, Jagust WJ. Brain imaging in the study of Alzheimer's disease. *NeuroImage* 61: 505-16 (2012).

- [5] Tukiainen T, Tynkkynen T, Mäkinen VP, Jylänki P, Kangas A, Hokkanen J, *et al.* A multi-metabolite analysis of serum by ¹H NMR spectroscopy: Early systemic signs of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 356-61 (2008).
- [6] Zheng J, Dixon RA, Li L. Development of isotope labeling LC-MS for human salivary metabolomics and application to profiling metabolome changes associated with mild cognitive impairment. *Anal Chem* 84: 10802-11 (2012).
- [7] Greenberg N, Grassano A, Thambisetty M, Lovestone S, Legido-Quigley C. A proposed metabolic strategy for monitoring disease progression in Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 30: 1235-9 (2009).
- [8] Oresic M, Hyötyläinen T, Herukka SK, *et al.* Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 1: e57 (2011).
- [9] Wang G, Zhou Y, Huang FJ, Tang HD, Xu XH, Liu JJ, *et al.* Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Proteome Res* 13: 2649-58 (2014).
- [10] González-Domínguez R, García A, García-Barrera T, Barbas C, Gómez-Ariza JL. Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis in press* (2014).
- [11] Ibáñez C, Simó C, Martín-Álvarez PJ, Kivipelto M, Winblad B, Cedazo-Mínguez A, *et al.* Toward a predictive model of Alzheimer's disease progression using capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics. *Anal Chem* 84: 8532-40 (2012).
- [12] Ibáñez C, Simó C, Barupal DK, Fiehn O, Kivipelto M, Cedazo-Mínguez A, *et al.* A new metabolomic workflow for early detection of Alzheimer's disease. *J Chromatogr A* 1302: 65-71 (2013).
- [13] Kaddurah-Daouk R, Zhu H, Sharma S, *et al.* Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 3: e244 (2013).
- [14] Trushina E, Dutta T, Persson XMT, Mielke MM, Petersen RC. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. *Plos ONE* 8: e63644 (2013).
- [15] Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, *et al.* High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res* 4: 591-8 (2005).
- [16] Bujak R, García-Álvarez A, Rupérez FJ, Nuño-Ayala M, García A, Ruiz-Cabello J, *et al.* Metabolomics reveals metabolite changes in acute pulmonary embolism. *J Proteome Res* 13: 805-16 (2014).
- [17] Godzien J, García-Martínez D, Martínez-Alcazar P, Rupérez FJ, Barbas C. Effect of a nutraceutical treatment on diabetic rats with targeted and CE-MS non-targeted approaches. *Metabolomics* 9: 188-202 (2013).
- [18] van den Berg RA, Hoefsloot HJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7: 142 (2006).
- [19] Gonzalez-Dominguez R, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics* 104: 37-47 (2014).
- [20] Haynes CA, Allegood JC, Park H, Sullards MC. Sphingolipidomics: Methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J Chromatogr B* 877: 2696-708 (2009).
- [21] Vernez L, Hopfgartner G, Wenk M, Krahenbuhl S. Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 984: 203-13 (2003).
- [22] Masson P, Spagou K, Nicholson JK, Want EJ. Technical and biological variation in UPLC-MS-based untargeted metabolic profiling of liver extracts: application in an experimental toxicity study on galactosamine. *Anal Chem* 83: 1116-23 (2011).
- [23] Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res* 29: 1961-77 (2004).
- [24] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 98: 321-6 (2014).
- [25] Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, *et al.* Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 29: 691-7 (2012).
- [26] Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26: 421-5 (1991).
- [27] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem in press* (2014).

- [28] Li N, Liu W, Li W, Li S, Chen X, Bi K, *et al.* Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem* 43: 992-7 (2010).
- [29] Ryan SD, Whitehead SN, Swayne LA, Moffat TC, Hou W, Ethier M, *et al.* Amyloid-beta42 signals tau hyperphosphorylation and compromises neuronal viability by disrupting alkylacylglycerophosphocholine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20936-41 (2009).
- [30] Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: A shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 32: 845-56 (2007).
- [31] He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31: 398-408 (2010).
- [32] Han X, Holtzman D, McKeel DW, Kelley J, Morris JC. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: Potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82: 809-18 (2002).
- [33] Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, *et al.* Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS ONE* 6: e21643 (2011).
- [34] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gomez-Ariza JL. Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease. *Talanta* 131: 480-9 (2015).
- [35] Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, *et al.* Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287: 2678-88 (2012).
- [36] Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, *et al.* Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2070-5 (2004).
- [37] Kosicek M, Zetterberg H, Andreasen N, Peter-Katalinic J, Hecimovic S. Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 516: 302-5 (2012).
- [38] Mielke MM, Bandaru VVR, Haughey NJ, Rabins PV, Lyketsos CG, Carlson MC. Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol Aging* 31: 17-24 (2010).
- [39] Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, *et al.* BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* 31: 6850-7 (2011).
- [40] Ariga T, McDonald MP, Yu RK. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease - a review. *J Lipid Res* 49: 1157-75 (2008).
- [41] Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, Xia J, Fried LP, Yasar S, *et al.* Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 79: 633-41 (2012).
- [42] Benito C, Nuñez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, *et al.* Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23: 11136-41 (2003).
- [43] Mulder J, Zilberter M, Pasquaré SJ, Alpár A, Schulte G, Ferreira SG, *et al.* Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain* 134: 1041-60 (2011).
- [44] Sigauke E, Rakheja D, Kitson K, Bennett MJ. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: A clinical, biochemical, and molecular review. *Lab Invest* 83: 1543-54 (2003).
- [45] Maruszak, A., Żekanowski, C. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 320-30 (2011).
- [46] Ferreira IL, Resende R, Ferreiro E, Rego AC, Pereira CF. Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 11: 1193-206 (2010).
- [47] Weill-Engerer S, David JP, Szdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, *et al.* Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and non-demented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5138-43 (2002).
- [48] Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67: 259-79 (2002).

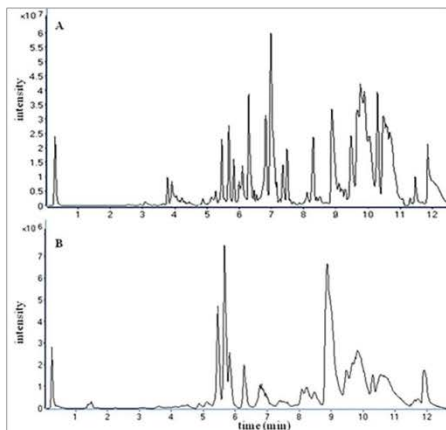


Fig. 1. Metabolomic fingerprints from serum samples obtained by UHPLC-ESI-QTOFMS in positive (A) and negative (B) ion mode

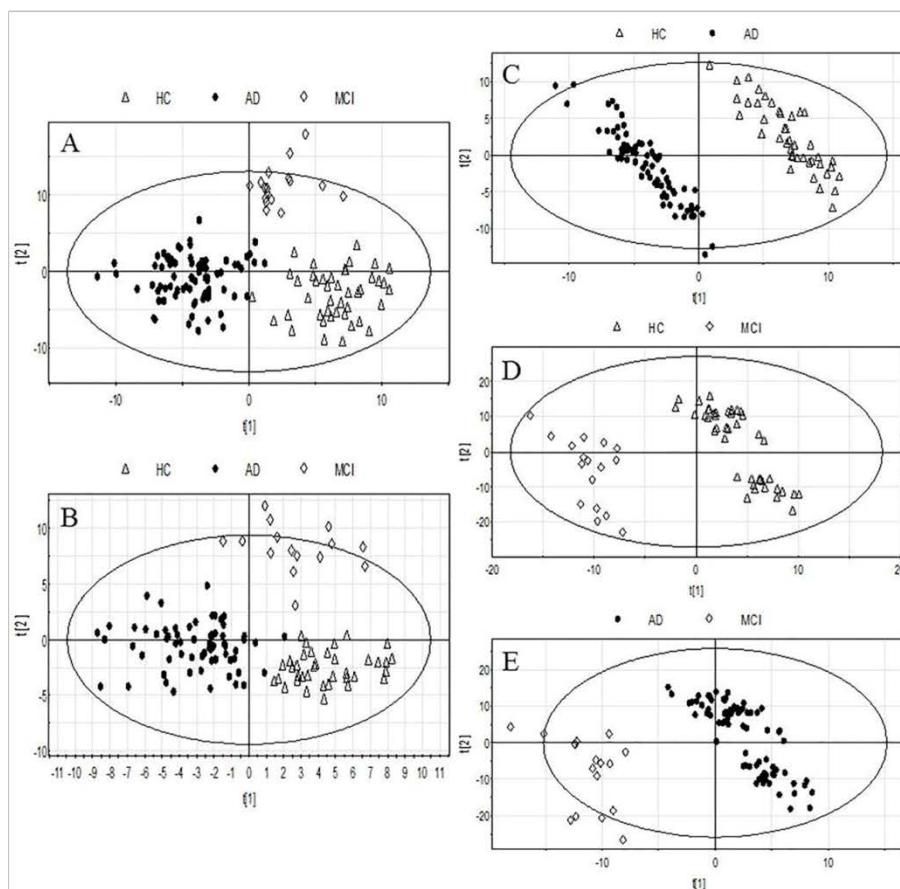


Fig. 2. PLS-DA scores plots from UHPLC-MS data. (A) Scores plot for all samples analyzed in positive ion mode (3 components, $R^2=0.84$, $Q^2=0.267$); (B) Scores plot for all samples analyzed in negative ion mode (3 components, $R^2=0.844$, $Q^2=0.032$); (C) Scores plot for two-class comparison, AD vs. HC (positive mode: 4 components, $R^2=0.996$, $Q^2=0.44$; negative mode: 2 components, $R^2=0.915$, $Q^2=0.125$);

(D) Scores plot for two-class comparison, MCI vs. HC (positive mode: 4 components, $R^2=0.999$, $Q^2=0.654$; negative mode: 3 components, $R^2=0.998$, $Q^2=0.085$); (E) Scores plot for two-class comparison, AD vs. MCI (positive mode: 4 components, $R^2=0.995$, $Q^2=0.496$; negative mode: it was not possible to build any model)

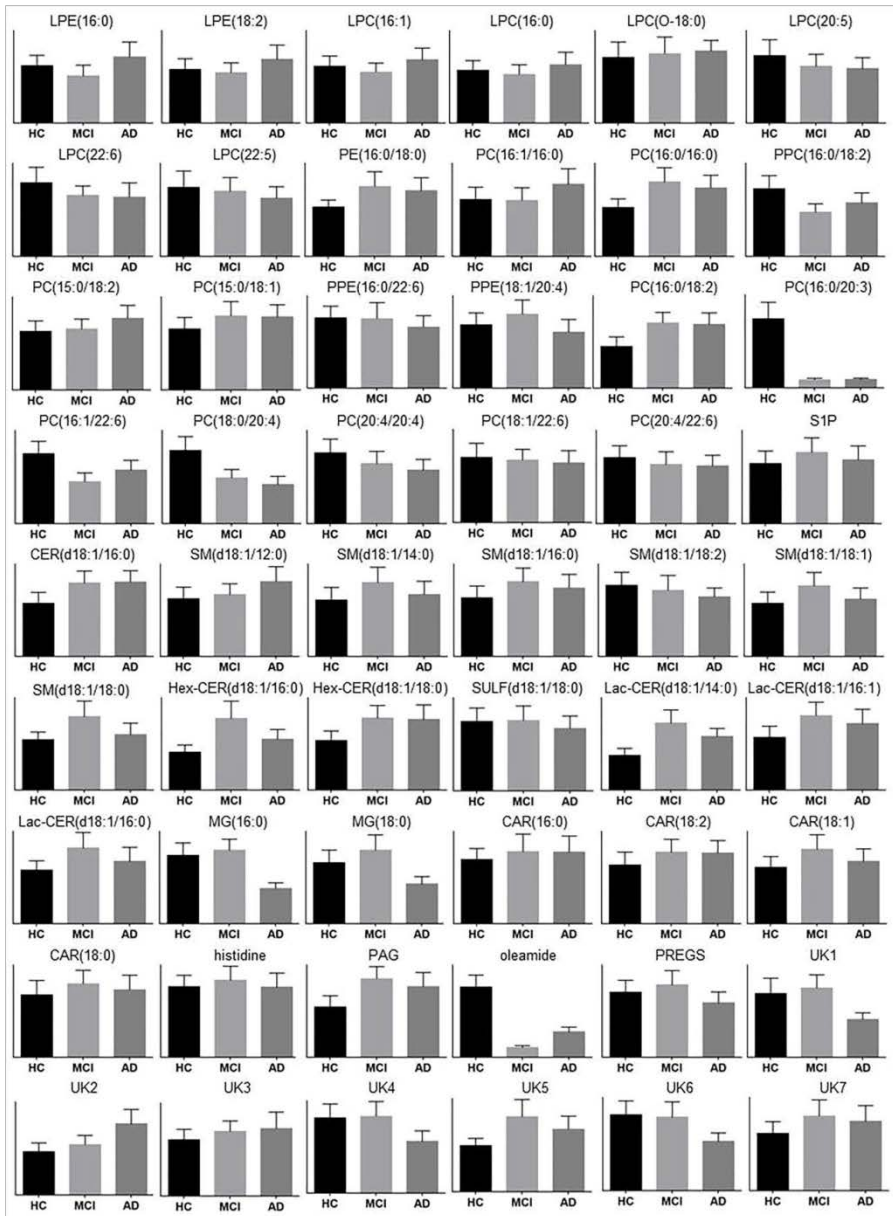


Fig. 3. Column plots with standard deviation bars for the discriminant metabolites identified in serum from AD and MCI patients

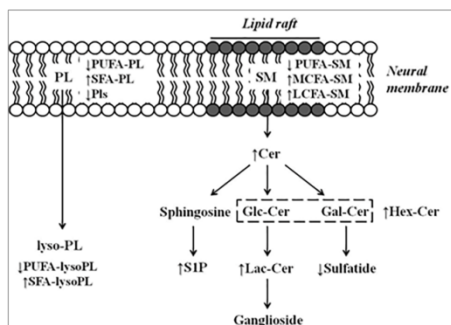


Fig. 4. Metabolic changes observed in phospholipids and sphingolipids due to membrane breakdown. (↑) increased compounds, (↓) decreased compounds

Table 1. Discriminant lyso-phospholipids and phospholipids identified in serum from AD and MCI patients

metabolite	mass (Da)	mass error (ppm)	RT (min)	ion mode	change (%)			p value
					AD/HC	AD/MCI	MCI/HC	
Lyso-phospholipids								
LPE (16:0)	453.2807	-10.6	5.51	P	+16.2	+39.9	NS	0.036
LPE (18:2)	477.2858	0.6	5.41	P	+21.2	+25.5	NS	0.001
				N	+23.2	+29.9	NS	0.006
LPC (16:1)	493.3111	-11.6	5.12	P	+21.8	+26.1	NS	0.040
				N	+21.3	+22.9	NS	0.047
LPC (16:0)	495.3310	-3.0	5.64	N	+11.8	+17.4	NS	0.028
LPC (O-18:0)	509.3783	-12.2	6.48	P	+10.7	NS	NS	0.042
LPC (20:5)	541.3115	-9.8	5.37	N	-16.6	NS	-13.2	0.009
LPC (22:6)	567.3281	-7.8	5.44	P	-20.4	NS	-18.9	0.007
LPC (22:5)	569.3415	-11.6	5.75	P	-14.6	NS	NS	0.012
Phospholipids								
PE(16:0/18:0)	719.5469	0.6	9.99	P	+31.9	NS	+44.0	0.035
PC(16:1/16:0)	731.5395	-9.6	9.67	N	+25.9	+32.5	NS	0.012
PC(16:0/16:0)	733.5593	-3.8	10.5	N	+39.9	NS	+50.7	0.001
PPC(16:0/18:2)	741.5612	-8.2	10.2	N	-24.3	NS	-34.3	0.003
PC(15:0/18:2)	743.5428	-4.8	9.45	N	+20.4	NS	NS	0.025
PC(15:0/18:1)	745.5640	2.5	10.1	P	+19.5	NS	NS	0.042
PPE(16:0/22:6)	747.5155	-6.4	9.74	P	-10.3	-10.2	NS	0.039
				N	-17.2	-20.6	NS	0.014
PPE(18:1/20:4)	749.5370	1.5	10.1	P	-28.4	-24.1	NS	0.002
				N	-14.4	NS	NS	0.046
PC(16:0/18:2)	757.5558	-8.3	9.85	N	+47.3	NS	+53.7	0.026
PC(16:0/20:3)	783.5772	-0.8	10.3	P	-88.3	NS	-88.1	0.037
PC(16:1/22:6)	803.5478	1.6	9.60	N	-25.4	NS	-41.8	0
PC(18:0/20:4)	809.5803	-16.2	10.3	P	-42.4	NS	NS	0.019
PC(20:4/20:4)	829.5533	-10.6	10.3	P	-22.9	NS	NS	0.011
PC(18:1/22:6)	831.5739	-4.7	9.6	P	-9.7	NS	NS	0.047
PC(20:4/22:6)	853.5538	-9.7	8.84	P	-13.4	NS	NS	0.041

Abbreviations. LPE: lyso-phosphoethanolamine; LPC: lyso-phosphocholine; PE: phosphoethanolamine; PC: phosphocholine; PPC: choline-plasmalogen; PPE: ethanolamine-plasmalogen; NS: non significant

Table 2. Discriminant sphingolipids identified in serum from AD and MCI patients

metabolite	mass (Da)	mass error (ppm)	RT (min)	ion mode	change (%)			p value
					AD/HC	AD/MCI	MCI/HC	
Sphingoid bases								
S1P	379.2433	-14.5	5.00	N	+7.9	NS	+16.8	0.016

Ceramides								
CER(d18:1/16:0)	537.5049	-13.4	10.8	P	+38.9	NS	+34.4	0.003
Sphingomyelins								
SM(d18:1/12:0)	646.4976	-11.4	7.44	P	+23.6	NS	NS	0.031
SM(d18:1/14:0)	674.5287	-11.1	8.11	P	+13.2	NS	+29.7	0.023
SM(d18:1/16:0)	702.5606	-9.9	8.89	P	+14.9	NS	+25.7	0.005
				N	+31.05	NS	+46.1	0.001
SM(d18:1/18:2)	726.5598	-10.7	8.47	P	-16.8	NS	NS	0.022
SM(d18:1/18:1)	728.5739	-12.8	9.12	P	+9.9	NS	+29.4	0.043
				N	+15.0	NS	+29.9	0.008
SM(d18:1/18:0)	730.5986	11.8	9.86	P	+11.1	NS	+47.6	0.005
Glycosphingolipids								
Hex-CER(d18:1/16:0)	699.5597	-7.4	9.50	P	+33.2	NS	+89.5	0.001
				N	+28.2	NS	+34.04	0.041
Hex-CER(d18:1/18:0)	741.5648	-14.4	10.3	P	+41.1	NS	+47.2	0.011
SULF(d18:1/18:0)	807.5563	4.1	9.73	P	-8.1	-10.6	NS	0.026
Lac-CER(d18:1/14:0)	833.5812	-6.2	8.17	P	+50.7	NS	+86.7	0.008
Lac-CER(d18:1/16:1)	859.5951	-2.2	8.32	P	+31.6	NS	+45.4	0.048
Lac-CER(d18:1/16:0)	861.6127	-5.8	8.95	P	+20.1	NS	+44.8	0.018

Abbreviations. SIP: sphingosine-1-phosphate; CER: ceramide; SM: sphingomyelin; Hex-CER: hexosyl-ceramide; SULF: sulfatide; Lac-CER: lactosyl-ceramide; NS: non significant

Table 3. Other discriminant metabolites identified in serum from AD and MCI patients

metabolite	mass (Da)	mass error (ppm)	RT (min)	ion mode	change (%)			p value
					AD/HC	AD/MCI	MCI/HC	
Monoglycerides								
MG(16:0)	330.2732	-11.5	7.02	P	-49.3	-52.3	NS	0.047
MG(18:0)	358.3034	-13.7	7.66	P	-34.6	-47.3	NS	0.007
Acyl-carnitines								
CAR(16:0)	399.3352	0.8	5.25	P	+12.3	NS	NS	0.012
CAR(18:2)	423.3299	-11.8	5.08	P	+18.9	NS	+19.7	0.011
CAR(18:1)	425.3468	-8.7	5.37	P	+9.4	NS	+29.9	0.004
CAR(18:0)	427.3620	-9.6	5.71	P	+10.5	NS	+17.4	0.049
Others								
histidine	155.0684	-7.1	0.26	N	-13.7	-11.3	NS	0.039
PAG	264.1072	-14.4	0.28	N	+38.0	NS	+57.2	0.040
oleamide	281.2690	-10.3	6.89	P	-63.1	NS	-86.1	0.025
PREGS	396.1922	-12.1	4.89	N	-17.8	-24.1	NS	0.039
Unknowns								
UK1	162.1025	-	3.67	P	-42.2	-46.1	NS	0.003
UK2	203.1281	-	5.51	P	+59.5	+42.8	NS	0
UK3	353.1752	-	6.52	P	+18.2	NS	NS	0.007
UK4	394.2793	-	7.64	N	-29.2	-30.1	NS	0.001
UK5	414.1996	-	4.86	P	+39.4	NS	+64.4	0.002
UK6	414.2259	-	7.02	P	-34.0	-32.8	NS	0.018
UK7	430.3029	-	5.46	P	+19.9	NS	+26.0	0.003

Abbreviations. MG(16:0): monopalmitin; MG(18:0): monostearin; CAR(16:0): palmitoyl-carnitine; CAR(18:2): linoleyl-carnitine; CAR(18:1): oleyl-carnitine; CAR(18:0): stearoyl-carnitine; PAG: phenyl-acetyl-glutamine; PREGS: pregnenolone sulfate; NS: non significant

METABOLITE PROFILING FOR THE IDENTIFICACION OF ALTERED METABOLIC PATHWAYS IN ALZHEIMER'S DISEASE

Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza

Table S1 Demographic characteristics of subjects enrolled in the study

sample ID	diagnosis	age (years)	gender	comorbidities	medication	family history (AD cases)
101	healthy control	70	M	Dyslipidemia	Simvastatin	0
102	healthy control	69	F	Dyslipidemia Diabetes type II Renal failure Heart failure Hemorrhagic stroke Hepatomegaly Hemiparesis	Linezolid Enoxaparin NTG AAS Diltiazem Fluconazole Furosemide Hydrochlorothiazide Ramipril Clotrimazole Clorazepate Omeprazole	0
105	healthy control	69	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis Heart failure	Losartan Hydrochlorothiazide Simvastatin Paracetamol Omeprazole	1
106	healthy control	75	M	Heart failure Sleep apnea	Irbesartan Torsemide Diltiazem Simvastatin AAS Sintrom Plantaben	0
107	healthy control	68	M	Hypertension	Hydrochlorothiazide	0
109	healthy control	70	M	Hypertension Lacunar stroke	Ramipril Clopidogrel Tamsulosin Dutasteride	1
110	healthy control	70	F	Hypertension COPD Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Tolterodine Alendronate Diltiazem Omeprazole Olmesartan Hydrochlorothiazide Tiotropium Simvastatin AAS	0
111	healthy control	76	F	Hyperthyroidism Chronic pharyngitis	Gabapentin Lorazepam Risedronate Codeine	0

112	healthy control	68	F	Anxiety Hiatal hernia Dyslipidemia	Simvastatin Buflomedil Calcium Risedronate Paroxetine Lormetazepam Esomeprazole Chelidon	1
113	healthy control	70	F	Dyslipidemia Cholecystectomy Hysterectomy	Rosuvastatin	1
114	healthy control	67	M	Diabetes type II Hyperkalemia Heart failure	Rosuvastatin Clopidogrel Valsartan AAS Furosemide	0
121	healthy control	67	M	COPD Dyslipidemia Phlebitis (leg)	AAS Simvastatin	0
123	healthy control	78	M	Heart failure Dyslipidemia	AAS Isosorbide. Amlodipine Atorvastatin	0
124	healthy control	72	F	Hypertension Dyslipidemia Doudenal ulcer Hiatal hernia	Captopril AAS Simvastatin Esomeprazole Cinitapride Paracetamol	0
128	healthy control	80	F	Hypertension Dyslipidemia Atrial fibrillation Leukoencephalopathy	Ipratropium Furosemide Olmesartan Sertraline Rosuvastatin Ivabradine Acetylcysteine Calcium Pantoprazole	0
129	healthy control	66	M	Hypertension Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Alfuzosin Telmisartan Hydrochlorothiazide	0
131	healthy control	76	F	Hypertension Dyslipidemia	Enalapril Simvastatin Metamizol Hemovas Esomeprazole	0
133	healthy control	79	M	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Ischemic heart failure Hypoacusia Benign prostatic hyperplasia	Gliclazide Olmesartan Atorvastatin AAS Clopidogrel Amlodipine Tamsulosin Zolpidem Furosemide Lorazepam	0

134	healthy control	65	F	Hypertension Diabetes type II Dyspnea type I	Metformin Glíbenclamíde Enalapril Timolol Bimatoprost	0
136	healthy control	72	F	Polyarthrosis	Paracetamol	0
137	healthy control	86	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Enalapril Simvastatine Torsemide Ibandronate Omeprazole Paracetamol	0
13	Alzheimer's disease	79	F		Midazolam Alprazolam Haloperidol	-
14	Alzheimer's disease	80	M	DVT	Acenocoumarol	-
21	Alzheimer's disease	81	M	Hypertension Diabetes type II Inguinal hernia	Metformin Enalapril Paracetamol	-
23	Alzheimer's disease	78	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure	Olmesartan Amlodipine Pravastatin Acenocoumarol	-
28	Alzheimer's disease	82	M	Dyslipidemia COPD	Atorvastatin Ascorbate	-
29	Alzheimer's disease	67	F	Hypertension	Amlodipine Enalapril Midazolam	-
30	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Dyslipidemia COPD	AAS Atorvastatin	-
31	Alzheimer's disease	80	M	Hypertension Diabetes type II	Paracetamol Codeine Cilostazol Enalapril AAS Omeprazole	-
32	Alzheimer's disease	86	F	Ocular hypertension Arthrosis	AAS Calcium Timolol Citicoline Simethicone Clebopride Biphosphonate	-
33	Alzheimer's disease	67	F	-	-	-
34	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Arthrosis	Metformin AAS Ramipril Hydrochlorothiazide Atenolol Isosorbide Simvastatin Metamizol	-

					Famotidine	
35	Alzheimer's disease	91	M	Hypertension Hyperuricemia Hiatal hernia	Irbesartan Allopurinol Cinitapride	-
36	Alzheimer's disease	78	M	Hypertension Heart failure Renal failure Hypoacusia	Captopril Lercanidipine Furosemide Acenocoumarol Digoxin Paraffin oil Ginkgo biloba Polystyrene sulfonate Trazodone Pantoprazole	-
37	Alzheimer's disease	76	F	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type II Hysterectomy	Losartan Hydrochlorothiazide Allopurinol Amiloride Ramipril Simvastatin Diosmin Metamizol	-
43	Alzheimer's disease	85	F	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type II Anxiety Anemia	Irbesartan Atenolol Lercanidipine Lorazepam Simvastatin AAS Fluoxetine Moxonidina Metformin Iron ovoalbumin Omeprazole	-
44	Alzheimer's disease	82	F	Diabetes type II Talassemia minor Benign breast tumor Cholecystectomy	Sitagliptin Metformin Trazodone AAS Lorazepam Ibuprofen Omeprazole	-
45	Alzheimer's disease	69	F	Chronic bronchitis Hypertension Hyperuricemia Osteoarthritis	Torsemide Cyproheptadine Budesonide Escitalopram Lorazepam	-
46	Alzheimer's disease	81	M	Hypertension Hepatitis C	Amlodipinoe Valsartan Megestrol	-
47	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Diabetes type I Glaucoma	Tramadol Insulin Losartan Hydrochlorothiazide Desmopressin	-
48	Alzheimer's disease	87	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure	Furosemide Olmesartan Omeprazole	-

49	Alzheimer's disease	77	F	Glaucoma Gonarthrosis	Citalopram Travoprost	-
50	Alzheimer's disease	79	F	Hypertension Diabetes type II	Verapamil Chlorthalidone Metformin Citalopram Omeprazole	-
51	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Dyslipidemia Arthrosis Anxiety	Telmisartan Hydrehlorothiazide Simvastatin Escitalopram Clorazepate Haloperidol Lorazepam Lansoprazole Paracetamol Metamizol	-

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Demographic characteristics of subjects enrolled in the study.

sample ID	diagnosis	age (years)	gender	comorbidities	medication	family history (AD cases)
101	healthy control	70	M	Dyslipidemia	Simvastatin	0
102	healthy control	69	F	Dyslipidemia Diabetes type II Renal failure Heart failure Hemorrhagic stroke Hepatomegaly Hemiparesis	Linezolid Enoxaparin NTG AAS Diltiazem Fluconazole Furosemide HCTZ Ramipril Clotrimazole Clorazepate Omeprazole	0
104	healthy control	71	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Paracetamol Calcium	0
105	healthy control	69	F	Hypertension Dyslipidemia Rheumatoid arthritis Heart failure	Losartan HCTZ Simvastatin Paracetamol Omeprazole	1
106	healthy control	75	M	Heart failure Sleep apnea	Irbesartan Torsemide Diltiazem Simvastatin AAS Sintrom Plantaben	0
107	healthy control	68	M	Hypertension	HCTZ	0
108	healthy control	65	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure Hypothyroidism	Losartan Simvastatin AAS Dronedarone Levothyroxine Indapamide	1
109	healthy control	70	M	Hypertension Lacunar stroke	Ramipril Clopidogrel Tamsulosin Dutasteride	1

110	healthy control	70	F	Hypertension COPD Dyslipidemia Rheumatoid arthritis	Tolterodine Alendronate Diltiazem Omeprazole Olmesartan HCTZ Tiotropium Simvastatin AAS	0
111	healthy control	76	F	Hyperthyroidism Chronic pharyngitis	Gabapentin Lorazepam Risedronate Codeine	0
113	healthy control	70	F	Dyslipidemia Cholecystectomy Hysterectomy	Rosuvastatin	1
114	healthy control	67	M	Diabetes type II Hyperkalemia Heart failure	Rosuvastatin Clopidogrel Valsartan AAS Furosemide	0
120	healthy control	67	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Alendronate Calcium Vit.D Simvastatin AAS Candesartan	1
121	healthy control	67	M	COPD Dyslipidemia Phlebitis (leg)	AAS Simvastatin	0
124	healthy control	72	F	Hypertension Dyslipidemia Doudenal ulcer Hiatal hernia	Captopril AAS Simvastatin Esomeprazole Cinitapride Paracetamol	0
125	healthy control	72	F	Hypertension Hypothyroidism Hyperuricemia	Enalapril Simvastatin Levothyroxine Heptaminol Deanol Paroxetine Diazepam Omeprazole	0
126	healthy control	70	M	Hypertension COPD Heart failure Vertiginous syndrome Hiatal hernia	AAS Salmeterol Fluticasone Enalapril Clorazepate Esomeprazole	0

128	healthy control	80	F	Hypertension Dyslipidemia Atrial fibrillation Leukoencephalopathy	Ipratropium Furosemide Olmesartan Sertraline Rosuvastatin Ivabradine Acetylcysteine Calcium Pantoprazole	0
129	healthy control	66	M	Hypertension Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Alfuzosin Telmisartan HCTZ	0
131	healthy control	76	F	Hypertension Dyslipidemia	Enalapril Simvastatin Metamizol Hemovas Esomeprazole	0
132	healthy control	69	F	Hypertension Dyslipidemia Hypothyroidism Glaucoma	Losartan HCTZ Levothyroxine Ibandronate Calcium	0
133	healthy control	79	M	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Ischemic heart failure Hypoacusia Benign prostatic hyperplasia	Gliclazide Olmesartan Atorvastatin AAS Clopidogrel Amlodipine Tamsulosin Zolpidem Furosemide Lorazepam	0
136	healthy control	72	F	Polyarthrosis	Paracetamol	0
137	healthy control	86	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Enalapril Simvastatine Torsemide Ibandronate Omeprazole Paracetamol	0
140	healthy control	66	F	Hypertension Diabetes type I Dyslipidemia Epilepsy Osteoporosis	Insulin Irbesartan AAS Valproate Atorvastatin Fentanyl	0

142	healthy control	70	M	Hypertension Diabetes type II Chronic hepatopathy	Enalapril Simvastatin AAS Metformin Glimepiride	0
143	healthy control	76	F	Dyslipidemia		0
144	healthy control	85	F	Hypertension Anxiety Circulatory failure	Amiloride Pentoxifylline Alprazolam	0
145	healthy control	79	F	Hypertension Dyslipidemia Ischemic heart failure	Telmisartan HCTZ Rosuvastatin Triflusal Diosmin Omeprazole	0
146	healthy control	71	F	Hypertension Diabetes type II Cholecystectomy	Clortalidone Propranolol Pioglitazone Insulin Metformin Sulodexide Loratadine Omeprazole	0
147	healthy control	67	F	Osteoporosis Anxiety	Calcium NSAID	0
148	healthy control	80	M	Asthmatic bronchitis Dyslipidemia Appendectomy Benign prostatic hyperplasia	Terbutaline Budesonide Simvastatin Alfuzosin Omeprazole	1
150	healthy control	75	F	Diabetes type II Dyslipidemia Atrophic gastritis	Enalapril Simvastatin Metformin AAS Cilostazol Lansoprazole	0
153	healthy control	68	F	Hypertension Dyslipidemia Myoma Dystonia	Enalapril Rosuvastatin Almagate Pilocarpine Hidrosmín Metamizol Omeprazole	0
154	healthy control	68	M	Hypertension	Eprosartan HCTZ Ranitidine	0

155	healthy control	76	M	DVT Vitrectomy	Heparin	0
156	healthy control	76	M	Hypertension COPD Hiatal hernia Hypothyroidism Cataracts	HCTZ Levothyroxine Pantoprazole	0
D1	Mild cognitive impairment	77	M	Dyslipidemia Cholecystectomy	AAS Atenolol Atorvastatin	-
D2	Mild cognitive impairment	68	M	Dyslipidemia Asthmatic bronchitis Cerebral stroke Hypotension	Tiotropium Simvastatin Clopidogrel Formoterol Budesonide Montelukast	-
D3	Mild cognitive impairment	76	M	Benign prostatic hyperplasia Chronic pharyngitis	Tamsulosin	-
D5	Mild cognitive impairment	82	F	Hypertension Gastrointestinal bleeding Dyslipidemia Polyarthrosis	Pitavastatin Amlodipine Olmesartan Rabeprazole Tramadol Paracetamol AAS Calcium Vit. D Iron sulfate	-
D6	Mild cognitive impairment	79	F	Hypertension Dyslipidemia Thalassemia minor Cholecystectomy DVT Acute nephritis	Losartan Atorvastatin AAS Daflon Omeprazole	-
D7	Mild cognitive impairment	75	F	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type I Hypothyroidism Anemia Renal failure Hyperuricemia Rizarthrosis	Olmesartan Amlodipine Simvastatin Insulin Levothyroxine AAS Furosemide Folate Vit. B12 Citalopram Omeprazole	-

D9	Mild cognitive impairment	83	M	Hypertension Dyslipidemia Diabetes type II	Enalapril AAS Simvastatin Insulin Metformin Solifenacin	-
D10	Mild cognitive impairment	68	M	Hypertension Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Tamsulosin Amlodipine Atorvastatin Omeprazole	-
D12	Mild cognitive impairment	70	M	Palmar psoriasis Hiatal hernia	Cinarizina Betahistine	-
D13	Mild cognitive impairment	79	M	Hypertension COPD Dyslipidemia Hyperuricemia	Enalapril HCTZ Bisoprolol Torasemide AAS NTG Pravastatin Sintrom Alprazolam Plusvent Allopurinol	-
D14	Mild cognitive impairment	78	F	Hypertension	Eprosartan AAS Raloxifene Lormetazepam Omeprazole	-
D15	Mild cognitive impairment	79	F	Hypertension Hypothyroidism	Valsartan Levothyroxine Paracetamol Omeprazole	-
D16	Mild cognitive impairment	79	F	Hypertension Diabetes type II Osteoporosis	Enalapril Verapamil Metformin Sintrom Fluoxetine Paracetamol Omeprazole	-
D17	Mild cognitive impairment	86	F	Hypertension Heart failure	Valsartan HCTZ Sintrom Omeprazole	-

3	Alzheimer's disease	76	F	Hypertension Diabetes type II Heart failure Osteoporosis Gallstones	Amlodipine Valsartan Atenolol Quinapril AAS Acarbose Esomeprazole	-
4	Alzheimer's disease	82	F	COPD	AAS	-
5	Alzheimer's disease	72	M	Hypertension Benign prostatic hyperplasia	-	-
7	Alzheimer's disease	83	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia	Alprazolam Amitriptyline Medazepam Eprosartan HCTZ	-
8	Alzheimer's disease	80	M	-	-	-
12	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Diabetes type II	Calcium Vit. D Ibandronate Metformin Captopril Ranelate Losartan HCTZ Omeprazole	-
13	Alzheimer's disease	79	F	-	Midazolam Alprazolam Haloperidol	-
20	Alzheimer's disease	83	M	Hypertension Renal failure	Amlodipine Olmesartan HCTZ AAS	-
24	Alzheimer's disease	88	M	Diabetes type II Hypoacusia	-	-
25	Alzheimer's disease	67	F	Hypotension Rheumatoid arthritis Psoriasis	Citicoline Deflazacort AAS Acutil	-

26	Alzheimer's disease	85	M	Ischemic heart failure Dyslipidemia Hypertension	NTG Clopidogrel AAS Atorvastatin Ramipril Carvedilol Furosemide Ranitidine	-
29	Alzheimer's disease	67	F	Hypertension	Amlodipine Enalapril Midazolam	-
30	Alzheimer's disease	75	M	Hypertension Dyslipidemia COPD	AAS Atorvastatin	-
31	Alzheimer's disease	80	M	Hypertension Diabetes type II	Paracetamol Codeine Cilostazol Enalapril AAS Omeprazole	-
33	Alzheimer's disease	67	F	-	-	-
34	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Arthrosis	Metformin AAS Ramipril HCTZ Atenolol Isosorbide Simvastatin Metamizol Famotidine	-
35	Alzheimer's disease	91	M	Hypertension Hyperuricemia Hiatal hernia	Irbesartan Allopurinol Cinitapride	-
36	Alzheimer's disease	78	M	Hypertension Heart failure Renal failure Hypoacusia	Captopril Lercanidipine Furosemide Acenocoumarol Digoxin Paraffin oil Ginkgo biloba Polystyrene sulfonate Trazodone Pantoprazole	-
40	Alzheimer's disease	76	F	Diabetes type II Sleep apnea	Metformin Glibenclamide Alprazolam	-

45	Alzheimer's disease	69	F	Chronic bronchitis Hypertension Hyperuricemia Osteoarthritis	Torsemide Cyproheptadine Budesonide Escitalopram Lorazepam	-
47	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Diabetes type I Glaucoma	Tramadol Insulin Losartan HCTZ Desmopressin	-
48	Alzheimer's disease	87	F	Hypertension Dyslipidemia Heart failure	Furosemide Olmesartan Omeprazole	-
50	Alzheimer's disease	79	F	Hypertension Diabetes type II	Verapamil Chlorthalidone Metformin Citalopram Omeprazole	-
51	Alzheimer's disease	82	F	Hypertension Dyslipidemia Arthrosis Anxiety	Telmisartan HCTZ Simvastatin Escitalopram Clorazepate Haloperidol Lorazepam Lansoprazole Paracetamol Metamizol	-
53	Alzheimer's disease	87	M	Digestive problems	Omeprazole Lactulose	-
54	Alzheimer's disease	83	F	Thyroidectomy Hypertension Bronchitis	Amlodipine Valsartan Levothyroxine Digoxin Acetylcysteine Alprazolam Fluticasone Salmeterol	-
55	Alzheimer's disease	81	M	Ischemic colitis	Trazodone	-
56	Alzheimer's disease	83	M	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia	Insulin AAS Enalapril Metformina Glicazide Simvastatin	-

59	Alzheimer's disease	81	F	Hypertension Dyslipidemia	Olmesartan NTG Amiodarone Atorvastatin AAS Citicoline Omeprazole	-
61	Alzheimer's disease	83	M	Hypertension Hyperuricemia Atrial fibrillation Hypothyroidism Pituitary microadenoma	Enalapril Furosemide Carvedilol Levothyroxine Allopurinol Lorazepam	-
64	Alzheimer's disease	77	M	Hypertension COPD Scleroderma Xeroderma Osteoporosis	Valsartan Torsemide Prednisone Metotrexate AAS Folate Tiotropium Penicillamine Pentoxifylline Domperidone Alendronate Paroxetine Iron Alprazolam Calcium Vit. D Omeprazole	-
65	Alzheimer's disease	78	M	Dyslipidemia COPD Hypothyroidism Hyperuricemia Benign prostatic hyperplasia	Valsartan Levothyroxine Risperidone Clometiazol Permixon	-
66	Alzheimer's disease	88	M	Heart failure Hypertension Benign prostatic hyperplasia Arthrosis	Propranolol Furosemide Atorvastatin Finasteride AAS Clorazepate Omeprazole	-
67	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Hepatitis C Osteoporosis	Bromazepam Silymarin Diosmin Alendronate	-

68	Alzheimer's disease	82	M	Hypertension Ischemic heart failure Diabetes type II COPD Benign prostatic hyperplasia	Enalapril Simvastatin Atenolol Lercanidipine Tamsulosin Doxazosin AAS Metformin Omeprazole	-
69	Alzheimer's disease	80	F	Hypertension Dyslipidemia Osteoporosis	Losartan HCTZ Simvastatin Tramadol Paracetamol Buprenorfine Diclofenac Escitalopram Omeprazole	-
72	Alzheimer's disease	79	F	Hypertension Diabetes type II COPD Arrhythmia	Ramipril Amlodipine Furosemide Rosuvastatin Metformin Sintrom Ipratropium Insulin Pantoprazole	-
73	Alzheimer's disease	85	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Heart failure Hypoacusia Spondyloarthrosis	Enalapril Insulin Simvastatin Nimodipine Metformin Glimepride AAS Lorazepam Omeprazole	-
74	Alzheimer's disease	85	F	Hypertension Dyslipidemia Arthrosis	Enalapril HCTZ Simvastatin	-
75	Alzheimer's disease	77	F	Hypertension Diabetes type II Dyslipidemia Atrial fibrillation	Enalapril Simvastatin Metformin Sintrom Repaglinide Etoricoxib Omeprazole	-

76	Alzheimer's disease	80	M	Hypertension Dyslipidemia Benign prostatic hyperplasia	Olmesartan Tamsulosin Pravastatin Finasteride Alendronate AAS Escitalopram Lorazepam Acetylcysteine Lactitol Calcium Metamizol Omeprazole	-
77	Alzheimer's disease	85	F	COPD	Salbutamol Citalopram	-

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES METALÓMICOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SU PROGRESIÓN DESDE EL DETERIORO COGNITIVO LEVE

Artículo 10. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* 9:292-300.

Artículo 11. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. *Biometals* 27:539-549.

Capítulo 3

Los artículos relacionados más abajo han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU), enlace a la revista y resumen.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease". *Metallomics*. Nº 6, págs. 292-300. DOI: /10.1039/C3MT00301A

Enlace al artículo:

<https://dx.doi.org/10.1039/C3MT00301A>

RESUMEN:

Metal dyshomeostasis is closely related to Alzheimer's disease, so the characterization of the metal profiles in these patients is of special interest for studying associated neurodegenerative processes and to discover potential markers of disease. An analytical approach, based on non-denaturing precipitation of proteins, has been optimized for the fractionation of high molecular mass (HMM) and low molecular mass (LMM) metal-species from serum, which were subjected to multielemental analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This methodology was applied to healthy controls, Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) patients in order to study the progression of dementia. Thus, it was found that some metals, such as iron, copper, zinc and aluminium, suffer progressive changes along the advance of neurodegeneration, suggesting that these imbalances could be related to the decline of cognitive functions. On the other hand, elements such as manganese, lithium or vanadium allow discriminating between controls and diseased subjects, both AD and MCI, but no differences were found between these two clinical stages, so they could be considered as precursors in the early development of neurodegenerative failures. In addition, it should be noted the important role that low molecular mass fractions of iron, copper, aluminium and cobalt appear to play in pathogenesis of Alzheimer. Finally, correlation analysis indicated that these metal abnormalities can be interrelated, participating in common processes such as oxidative stress, altered homeostasis and uptake into brain, as well as impaired glucose metabolism.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease". *Biometals*. Vol. 27, n. 3, págs. 539-549. DOI: 10.1007/s10534-014-9728-5

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
<https://dx.doi.org/10.1007/s10534-014-9728-5>

RESUMEN:

In order to study the involvement of metals in the progression of Alzheimer's disease, serum samples from patients with Alzheimer and mild cognitive impairment were investigated. For this purpose, metal content was analyzed after size-fractionation of species and then, inter-element and inter-fraction ratios were computed. In this way, the analysis allowed discovering changes that could be used as markers of disease, but also provided a new insight into the interactions in the homeostasis of elements in neurodegeneration and its progression. Aluminum and labile forms of iron and copper were increased in demented patients, while manganese, zinc and selenium were reduced. Interestingly, levels of different elements, principally iron, aluminum and manganese, were closely inter-related, which could evidence a complex interdependency between the homeostasis of the different metals in this disorder. On the other hand, imbalances in metabolism of copper, zinc and selenium could be associated to abnormal redox status. Therefore, this study may contribute to our understanding of the pathological mechanisms related to metals in Alzheimer's disease.

Los elementos metálicos y metaloides juegan un papel de gran importancia en los sistemas biológicos, regulando y participando en numerosos procesos celulares. En particular, su equilibrio es crítico en el sistema nervioso central, donde son esenciales en diversas funciones neuronales como los sistemas de neurotransmisión, el mantenimiento de mielinas, actividades enzimáticas o la función mitocondrial, entre otras. En este contexto, la determinación del contenido total de metales en distintas muestras biológicas ha demostrado un gran potencial para el estudio de la enfermedad de Alzheimer (sección 3.3, Introducción). Sin embargo, estos elementos metálicos pueden encontrarse en múltiples formas químicas, principalmente iones lábiles y complejos con ligandos orgánicos como aminoácidos o ácidos orgánicos (especies de bajo peso molecular, LMM), o formando parte de metaloproteínas (especies de alto peso molecular, HMM). Esta distinción entre las fracciones metálicas de bajo y alto peso molecular es de vital importancia, ya que la forma en que estos metales se encuentran en los sistemas biológicos finalmente repercute en sus propiedades toxicológicas, actividad biológica y movilidad entre distintos compartimentos biológicos. Por ello, la caracterización de estos perfiles metalómicos puede proporcionar una visión más completa sobre el papel de estos metales en la patogénesis de la EA. Con este propósito, las muestras de suero sanguíneo de pacientes de EA, DCL y controles sanos fueron tratadas mediante un procedimiento de precipitación de proteínas en condiciones no desnaturizantes para separar las especies metálicas en función del tamaño, y a continuación, tanto el sobrenadante (LMM) como el precipitado (HMM) se sometieron a análisis multi-elemental mediante ICP-MS. De forma complementaria, el contenido total de metales (TOTAL) de estas muestras se determinó tras una simple dilución. Además, con el fin de investigar la interdependencia del metabolismo de los distintos metales en el organismo, se realizaron análisis de correlación de Spearman y se calcularon los correspondientes ratios elementales.

La aplicación de esta plataforma metalómica reveló alteraciones en las concentraciones de numerosos metales en suero, tanto esenciales (*e.g.* hierro, cobre, zinc, manganeso, selenio) como tóxicos (*e.g.* aluminio). Complementariamente, los análisis de correlación demostraron que los cambios en la homeostasis de estos metales en respuesta a la progresión de los procesos neurodegenerativos en la EA están inter-relacionados. Los ratios inter-elementales, calculados para cada fracción (*i.e.* TOTAL, HMM, LMM;

Tabla 3, Artículo 11), permitieron descubrir el efecto de las alteraciones en un metal particular sobre la homeostasis del resto de elementos en cada nivel de organización estructural. Sin embargo, en el caso particular del aluminio y el manganeso, los ratios inter-elementales entre distintas fracciones también mostraron cambios significativos (Tabla 4, Artículo 11), lo cual podría sugerir que las correlaciones inter-elementales no sólo ocurren entre especies estructuralmente análogas, evidenciando la complejidad de la bioquímica celular de los metales. Por último, los ratios LMM/TOTAL fueron computados para cada elemento con el fin de evaluar la labilidad de los enlaces metal-biomolécula y la correspondiente liberación de iones metálicos, lo cual podría servir como un indicativo de estrés oxidativo inducido por la generación de radicales libres.

❖ Hierro, cobre y zinc

El procedimiento metalómico previamente descrito permitió relacionar la patogénesis de la EA con anormalidades en los tres metales de transición mayoritarios (*i.e.* hierro, cobre y zinc). Considerando el contenido TOTAL y la fracción HMM, los niveles séricos de hierro y zinc sufrieron una disminución progresiva a lo largo del desarrollo de la enfermedad (EA<DCL<control), mientras que en el caso del cobre se observó un aumento a medida que los déficits cognitivos empeoran (EA>DCL>control). Además, los coeficientes de correlación y ratios inter-elementales calculados demostraron que la homeostasis de estos metales está estrechamente relacionada con la de otros elementos (*e.g.* aluminio, manganeso, molibdeno, cobalto). Estas inter-relaciones podrían asociarse a la existencia de mecanismos competitivos de transporte y asimilación cerebral comunes para todos estos metales, como el transporte mediado por transferrina o los transportadores de metales divalentes.

Alternativamente, el análisis de la fracción LMM reveló un aumento del contenido de hierro y cobre en suero de DCL y EA. Además, el ratio LMM/TOTAL calculado para estos dos metales también mostró un incremento significativo en muestras de EA. La liberación de estos metales lábiles podría asociarse a fallos en las proteínas que regulan su metabolismo, como la ferritina, transferrina o ceruloplasmina, lo cual finalmente conduce a la producción de radicales libres y la inducción de estrés oxidativo.

❖ Manganeseo

Los niveles de manganeseo se encontraron significativamente reducidos en suero tanto de EA como DCL, lo cual podría asociarse exclusivamente a una sub-expresión de metalo-proteínas, ya que no se observaron especies de Mn en la fracción LMM. Los ratios inter-elementales Mn/M (M: Fe, Cu, Zn, Al, etc) demostraron una gran interdependencia del metabolismo del manganeseo con otros metales de transición, en línea con los hallazgos previamente descritos para el hierro, cobre y zinc. Por último, cabe destacar que estas anomalías podrían asociarse a un mecanismo patológico temprano, ya que los niveles séricos de Mn permitieron discriminar entre controles y pacientes enfermos, pero no entre las dos etapas clínicas estudiadas (EA y DCL).

❖ Aluminio

Los perfiles metalómicos obtenidos mostraron un aumento progresivo del contenido de aluminio en todas las fracciones analizadas a lo largo de la progresión de la enfermedad (control<DCL<EA). Sin embargo, esta tendencia es especialmente destacable en la fracción LMM, la cual sólo representa el 10% del total, pero dobla su concentración en suero de EA. Como reflejan los cambios detectados en los ratios elementales calculados, este contenido anormal de aluminio puede afectar a la distribución de otros elementos. Entre estas interacciones, cabe destacar la estrecha relación entre la homeostasis del Al y el Fe, ya que ambos se transportan mediante su unión a transferrina. Además, este mecanismo competitivo de transporte puede explicar la toxicidad inducida por el aluminio, ya que aunque este metal no presenta actividad redox, la competición con iones férricos por la unión a transferrina causa la liberación de este último, promoviendo así la formación de radicales libres. En este sentido, los coeficientes de Spearman mostraron una correlación positiva entre los niveles de hierro, cobre, aluminio y cobalto en la fracción LMM, demostrando la participación de todos estos metales en la inducción del estrés oxidativo asociado al desarrollo de la EA.

❖ Selenio

El contenido total de selenio y selenoproteínas se vio reducido en muestras de suero de pacientes afectados por la EA, mientras que los niveles de seleno-metabolitos se encontraron disminuidos tanto en EA como DCL. También se observó un incremento en los ratios inter-elementales entre distintos metales y selenio, lo cual permitiría relacionar la disminución de este metaloide con una

respuesta protectora frente al estrés oxidativo inducido por metales. Además, la disminución del ratio LMM/TOTAL refleja un cambio en el metabolismo del selenio en pacientes de EA, probablemente como consecuencia de un mecanismo regulatorio para mantener los niveles de selenoenzimas esenciales, a costa de la disminución del contenido de especies de bajo peso molecular.

❖ **Otros metales**

La concentración de vanadio (TOTAL y HMM) se vio ligeramente aumentada en suero de EA y DCL, y además se pudo correlacionar positivamente con otros metales como el selenio, cromo y zinc, todos ellos implicados en desórdenes glucometabólicos.

Por el contrario, los niveles de litio se encontraron reducidos en suero tanto de EA como DCL. El análisis de correlación permitió relacionar el metabolismo de este elemento al del aluminio y el cobalto, probablemente debido al efecto neuroprotector del litio frente a la toxicidad inducida por el aluminio y su capacidad para mejorar el transporte intra-celular de folato y B12, respectivamente.

Por último, también se observó una disminución del contenido sérico de molibdeno en pacientes de EA, lo cual puede tener importantes consecuencias metabólicas debido a la esencialidad de este elemento como cofactor de distintas enzimas.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS METABOLÓMICO DE SUERO, CEREBRO Y ÓRGANOS PERIFÉRICOS DEL RATÓN TRANSGÉNICO APP/PS1 PARA CARACTERIZAR DE FORMA INTEGRAL LAS PERTURBACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Artículo 12. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Application of metabolomics based on direct mass spectrometry analysis for the elucidation of altered metabolic pathways in serum from the AAPP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal* 107:378-385.

Artículo 13. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Deciphering metabolic abnormalities associated with Alzheimer's disease in serum from the APP/PS1 mouse model using integrated metabolomics approaches. *Biochimie* 110:119-128.

Artículo 14. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 102:425-435.

Artículo 15. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:2395-2402.

Artículo 16. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. High throughput multi-organ metabolomics in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Electrophoresis* (aceptado).

Artículo 17. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model. *Mol Biosystems* (enviado).

Artículo 18. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomics reveals significant impairments in the immune system of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 36:577-587.

Capítulo 4

Los artículos relacionados más abajo han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU), enlace a la revista y resumen.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Application of metabolomics based on direct mass spectrometry analysis for the elucidation of altered metabolic pathways in serum from the AAPP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 107, págs. 378-385, (2015). DOI: 10.1016/j.jpba.2015.01.025

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.025>

RESUMEN:

Metabolomic analysis of brain tissue from transgenic mouse models of Alzheimer's disease has demonstrated a great potential for the study of pathological mechanisms and the development of new therapies and biomarkers for diagnosis. However, in order to translate these investigations to the clinical practice it is necessary to corroborate these findings in peripheral samples. To this end, this work considers the application of a novel metabolomic platform based on the combination of a two-steps extraction procedure with complementary analysis by direct infusion electrospray mass spectrometry and flow infusion atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for a holistic investigation of metabolic abnormalities in serum samples from APP/PS1 mice. A number of metabolites were found to be perturbed in this mouse model, including increased levels of di- and tri-acylglycerols, eicosanoids, inosine, choline and glycerophosphoethanolamine; reduced content of cholesteryl esters, free fatty acids, lysophosphocholines, amino acids, energy-related metabolites, phosphoethanolamine and urea, as well as abnormal distribution of phosphocholines depending on the fatty acid linked to the molecular moiety. This allowed the elucidation of possible pathways disturbed underlying to disease (abnormal homeostasis of phospholipids leading to membrane breakdown, energy-related failures, hyperammonemia and hyperlipidemia, among others), thus demonstrating the utility of peripheral samples to investigate pathology in the APP/PS1 model.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Deciphering metabolic abnormalities associated with Alzheimer's disease in serum from the APP/PS1 mouse model using integrated metabolomics approaches". *Biochimie*. Vol. 110, págs. 119-128, (2015). DOI: 10.1016/j.biochi.2015.01.005

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.005>

RESUMEN:

The transgenic mouse APP/PS1 is widely employed by neuroscientists because reproduces well some of the neuropathological and cognitive deficits observed in human Alzheimer's disease. In this study, serum samples from APP/PS1 mice (n = 30) and wild-type controls (n = 30) were analyzed using a metabolomic multiplatform based on the combination of gas chromatography-mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, in order to obtain wide information about serum metabolome. Metabolic profiles showed significant differences between the groups of study, and numerous metabolites were identified as potential players in the development of Alzheimer-type disorders in this transgenic model. Pathway analysis revealed the involvement of multiple metabolic networks in the underlying pathology, such as deficiencies in energy metabolism, altered amino acid homeostasis, abnormal membrane lipid metabolism, and other impairments related to the integrity of the central nervous system. It is noteworthy that some of these metabolomic markers are in accordance with pathological alterations observed in human Alzheimer's disease, while others have not been previously described. Therefore, these results demonstrate the potential of metabolomics and the use of transgenic animal models to understand the pathogenesis of Alzheimer's disease.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 102, págs. 425-435, (2015). DOI: 10.1016/j.jpba.2014.10.009

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.009>

RESUMEN:

The identification of pathological mechanisms underlying to Alzheimer's disease is of great importance for the discovery of potential markers for diagnosis and disease monitoring. In this study, we investigated regional metabolic alterations in brain from the APP/PS1 mice, a transgenic model that reproduces well some of the neuropathological and cognitive deficits observed in human Alzheimer's disease. For

this purpose, hippocampus, cortex, cerebellum and olfactory bulbs were analyzed using a high-throughput metabolomic approach based on direct infusion mass spectrometry. Metabolic fingerprints showed significant differences between transgenic and wild-type mice in all brain tissues, being hippocampus and cortex the most affected regions. Alterations in numerous metabolites were detected including phospholipids, fatty acids, purine and pyrimidine metabolites, acylcarnitines, sterols and amino acids, among others. Furthermore, metabolic pathway analysis revealed important alterations in homeostasis of lipids, energy management, and metabolism of amino acids and nucleotides. Therefore, these findings demonstrate the potential of metabolomic screening and the use of transgenic models for understanding pathogenesis of Alzheimer's disease.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease". Vol. 1842, n. 12, págs. 2395–2402, (2014). DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.09.014

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.014>

RESUMEN:

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder worldwide, but its etiology is still not completely understood. The identification of underlying pathological mechanisms is becoming increasingly important for the discovery of biomarkers and therapies, for which metabolomics presents a great potential. In this work, we studied metabolic alterations in different brain regions of the APP/PS1 mice by using a high-throughput metabolomic approach based on the combination of gas chromatography–mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry. Multivariate statistics showed that metabolomic perturbations are widespread, affecting mainly the hippocampus and the cortex, but are also present in regions not primarily associated with AD such as the striatum, cerebellum and olfactory bulbs. Multiple metabolic pathways could be linked to the development of AD-type disorders in this mouse model, including abnormal purine metabolism, bioenergetic failures, dyshomeostasis of amino acids and disturbances in membrane lipids, among others. Interestingly, region-specific alterations were observed for some of the potential markers identified, associated with abnormal fatty acid composition of phospholipids and sphingomyelins, or differential regulation of neurotransmitter amino acids (e.g. glutamate, glycine, serine, N-acetyl-aspartate), not previously described to our knowledge. Therefore, these findings could provide a new insight into brain pathology in Alzheimer's disease.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "High throughput multi-organ metabolomics in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Electrophoresis". Vol. 36, n. 18, págs.. 2237–2249, (2015). DOI: 10.1002/elps.201400544

Enlace al artículo:

<https://dx.doi.org/10.1002/elps.201400544>

RESUMEN:

Metabolomics has demonstrated a great potential for the study of pathological mechanisms occurring in brain from Alzheimer's disease patients and transgenic models. However, its application to peripheral samples is not so common, although it can provide interesting information about systemic abnormalities underlying to disease. This work represents the first metabolomic investigation of multiple peripheral organs (liver, kidney, spleen, and thymus) from the APP/PS1 mice by using a high-throughput approach based on direct infusion MS. Our findings demonstrated that these organs suffer significant metabolic impairments related to energy metabolism (e.g. glycolysis, Krebs cycle, β -oxidation), lipid homeostasis (e.g. cellular membrane breakdown and fatty acid metabolism), degradation of nucleotides, oxidative stress, hyperammonemia, and metabolism of amino acids. It is noteworthy that many of these alterations have been previously described in brain, confirming the systemic character of this neurodegenerative disorder and the utility of peripheral samples to understand its pathogenesis.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model". Molecular Biosystems. Nº 11, págs. 2429-2440, (2015). DOI: 10.1039/C4MB00747F

Enlace al artículo:

<https://dx.doi.org/10.1039/C4MB00747F>

RESUMEN:

There is growing evidence that Alzheimer's disease may be a widespread systemic disorder, so peripheral organs could be affected by pathological mechanisms occurring in this neurodegenerative disease. For this reason, a double metabolomic platform based on the combination of gas chromatography-mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry was used for the first time to investigate metabolic changes in liver and kidney from the transgenic mice APP/PS1 against wild-type controls. Multivariate statistics showed significant differences in levels of numerous metabolites including phospholipids, sphingolipids, acylcarnitines, steroids, amino acids and other compounds, which denotes that multiple pathways might be associated with systemic pathogenesis of Alzheimer's in this mouse model,

such as bioenergetic failures, oxidative stress, altered metabolism of membrane lipids, hyperammonemia or impaired homeostasis of steroids. Furthermore, it is noteworthy that some novel pathological mechanisms were found, such as impaired gluconeogenesis, polyol pathway or metabolism of branched chain amino acids, not previously described for Alzheimer's disease. Therefore, these findings clearly support the hypothesis that Alzheimer's disease may be considered as a systemic disorder.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "Metabolomics reveals significant impairments in the immune system of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease". *Electrophoresis* Vol. 35, n. 4, págs. 577-587. DOI: 10.1002/elps.201400450

Enlace al artículo:

<https://dx.doi.org/10.1002/elps.201400450>

RESUMEN:

There Inflammatory processes and other failures related to the immune system are common features associated with Alzheimer's disease (AD), in both brain and the peripheral system. Thus, the study of the main organs of the immune system may have a great potential for the elucidation of pathological mechanisms underlying these abnormalities. This is the first metabolomic investigation performed in spleen and thymus from transgenic mice of AD. Tissues were fingerprinted using a metabolomic platform comprising GC-MS and ultra-HPLC-MS. Multivariate statistics demonstrated significant differences in numerous metabolites between the APP/PS1 mice and wild-type controls, and it was proven that multiple biochemical pathways are disturbed in these organs including abnormal metabolism of phospholipids, energy deficiencies, altered homeostasis of amino acids, oxidative stress, and others. Therefore, these findings highlight the importance of the proper metabolic functioning of peripheral immune system in the development of neurodegenerative disorders such as AD.

En los artículos que dan soporte a este Capítulo se describe la aplicación de distintas plataformas metabolómicas en múltiples órganos y fluidos biológicos del ratón transgénico APP_{swe}/PS1_{ΔE9} con el fin de caracterizar de forma integral la patología asociada a la enfermedad de Alzheimer. En primer lugar se aplicaron las técnicas de análisis directo previamente optimizadas (DI-ESI-MS y FIA-APPI-MS, esta última sólo en suero) para obtener un primer *screening* metabólico y así evaluar la utilidad de cada una de estas muestras para discriminar entre animales transgénicos y controles. Posteriormente, estas muestras se sometieron a análisis metabolómico mediante UHPLC-MS y GC-MS para obtener un perfil metabólico completo de cada una de las matrices biológicas estudiadas.

El análisis del suero sanguíneo reveló numerosas alteraciones metabólicas, análogas a las observadas en muestras de pacientes humanos de EA y DCL (Capítulos 1 y 2), demostrando el potencial de estos ratones transgénicos para investigar la patología característica de este desorden neurodegenerativo. Además, el empleo de estos animales modelo también permitió tener acceso a distintos órganos, lo cual es inviable en estudios con humanos. Las muestras de tejido cerebral presentan una gran utilidad para estudiar de forma directa los mecanismos neuropatológicos asociados a la EA. Así, en los trabajos incluidos en esta Tesis se analizaron distintas áreas cerebrales con el fin de investigar la especificidad regional de estas alteraciones metabólicas, incluyendo hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, estriado y bulbos olfatorios. Alternativamente, también se estudiaron otros tejidos del sistema periférico para evaluar el carácter sistémico de la EA, como hígado, riñón (órganos metabólicamente activos), bazo y timo (órganos del sistema inmune).

Los resultados obtenidos evidenciaron perturbaciones comunes a todos los compartimentos biológicos investigados en numerosas rutas metabólicas, incluyendo alteraciones en lípidos de membrana, fallos en el metabolismo energético, estrés oxidativo o hiperamonemia, entre otros, demostrando la implicación tanto del sistema nervioso central como del periférico en el desarrollo de la patología de la EA en el ratón transgénico APP/PS1. Sin embargo, cabe destacar que los niveles de algunos metabolitos mostraron una regulación diferencial dependiendo del tejido analizado, lo cual podría ser indicativo de alteraciones selectivas del órgano investigado (*e.g.* metabolismo de aminoácidos).

❖ Metabolismo de fosfolípidos

Los perfiles metabolómicos obtenidos mediante DI-ESI-MS y UHPLC-MS mostraron una reducción significativa del contenido de ácidos grasos poliinsaturados en numerosas clases de fosfolípidos en todas las muestras analizadas, en línea con los resultados previamente descritos en suero sanguíneo de pacientes de la EA (Capítulos 1 y 2). Sin embargo, esta disminución en los niveles de PUFA-PL se vio acompañada por un aumento paralelo de compuestos saturados, principalmente derivados del ácido esteárico. Además, se detectó un incremento de fosfolípidos derivados del ácido araquidónico en distintas regiones cerebrales (*i.e.* C18:0/C20:4-PL, C20:4-C20:4-PL), siendo la corteza cerebral el área más afectada. Este perfil anómalo de ácidos grasos podría ser indicativo de la existencia de importantes fallos en los mecanismos de biosíntesis y remodelación estructural de los fosfolípidos de membrana, potencialmente relacionados con los procesos de muerte neuronal observados en la EA. Los niveles de ácido docosatetraenoico y ácido docosapentaenoico también se encontraron aumentados en la fracción de fosfolípidos en tejido cerebral, lo cual podría asociarse a fallos peroxisómicos ya que estos ácidos grasos son intermedios en la biosíntesis de PUFAs en los peroxisomas. Por último, se observó una acumulación de algunos fosfolípidos minoritarios en tejido renal, como fosfatidil-gliceroles, fosfatidil-serinas y fosfatidil-inositoles, indicativo de fallos en la síntesis de cardiolipinas, mantenimiento de la simetría de las membranas celulares y disfunciones en el sistema de señalización del inositol, respectivamente.

Este metabolismo anormal de lípidos de membrana también se vio reflejado en los niveles de diversos metabolitos procedentes de la degradación de estos fosfolípidos. La hidrólisis de fosfolípidos mediante la acción de la fosfolipasa A₂ conduce a la liberación de ácidos grasos y liso-fosfolípidos que pueden acumularse en el tejido cerebral (Artículos 14 y 15). Sin embargo, el contenido de LPLs en muestras periféricas (*i.e.* suero, hígado, riñón, bazo, timo) se vio reducido en los ratones APP/PS1, en línea con los hallazgos previamente descritos en muestras de suero de pacientes de la EA, indicativo de un catabolismo acelerado de liso-fosfolípidos a nivel sistémico. Por el contrario, los niveles de LPLs derivados del ácido esteárico sí se encontraron aumentados en estas muestras periféricas, corroborando un metabolismo anormal de este ácido graso en los ratones APP/PS1. La acumulación de diglicéridos en suero y otros tejidos periféricos también puede considerarse

como un marcador de degradación de fosfolípidos, en este caso como consecuencia de la sobreexpresión de las fosfolipasas C y/o D. Por último, también se observó el aumento de numerosos catabolitos de bajo peso molecular en la mayoría de las matrices biológicas investigadas, incluyendo colina, fosfocolina, glicero-fosfocolina, glicero-fosfoetanolamina, glicero-fosfoinositol, glicerol y glicerol-3-fosfato. Sin embargo, estos metabolitos se encontraron disminuidos en timo, evidenciando un metabolismo específico de fosfolípidos en este órgano. En este sentido, el análisis metabolómico mediante DI-ESI-MS reveló que las alteraciones en los niveles de betaina, precursor de la colina, concuerdan con los cambios en el contenido de los catabolitos previamente descritos (aumentado en riñón y bazo, disminuido en timo, Artículo 16), lo que podría sugerir una regulación diferencial de la biosíntesis de fosfolípidos en estos órganos. Además, los niveles de etanolamina y fosfoetanolamina también mostraron tendencias opuestas dependiendo del tejido analizado (disminuido en suero y tejido cerebral, aumentado en hígado y riñón), probablemente debido a que estos metabolitos pueden actuar tanto como precursores o subproductos de degradación de las fosfatidil-etanolaminas. Para concluir, también se detectó un contenido anormal de mio-inositol y mio-inositol-1-fosfato en suero, cerebro y órganos periféricos, que podría relacionarse con un metabolismo alterado de fosfatidil-inositoles y fallos en el sistema de señalización del inositol. En particular, la homeostasis del mio-inositol y sus formas fosforiladas es de vital importancia en el sistema nervioso central, ya que la acumulación de mio-inositol en el tejido cerebral es un marcador clásico de astrogliosis y muerte neuronal.

❖ **Metabolismo de esfingolípidos**

El análisis metabolómico de las distintas regiones cerebrales mediante UHPLC-MS permitió detectar un incremento de esfingomielinas saturadas en hipocampo, así como una disminución de especies insaturadas en corteza cerebral y cerebelo, de forma similar a la tendencia observada en los niveles de fosfolípidos. Sin embargo, el hallazgo más notable fue la reducción de especies de cadena muy larga en todas las regiones investigadas (C22-C24), lo cual finalmente se vio reflejado en los niveles de estos esfingolípidos en suero (Artículo 13). Además, los perfiles metabólicos de suero también mostraron una disminución de algunas bases esfingoideas en los ratones APP/PS1 (*i.e.* esfinganina, hexadecaesfinganina, fitoesfingosina), corroborando un metabolismo anómalo de esfingolípidos.

Por el contrario, el análisis de los órganos periféricos demostró un aumento de estas esfingomielinas de cadena muy larga, acompañado de la disminución de las correspondientes ceramidas, evidenciando un cambio en el metabolismo sistémico de esfingolípidos hacia la acumulación de esfingomielinas.

❖ **Otros lípidos**

En línea con los resultados previamente descritos en relación al metabolismo de fosfolípidos y esfingolípidos, la reducción del contenido cerebral de colesterol (Artículos 14 y 15) también podría estar implicada en los procesos de desestabilización de membranas neuronales, debido al importante rol que juega este compuesto en la formación de balsas lipídicas. Además, esta reducción de los niveles de colesterol se vio acompañada por la disminución de otros derivados como el sulfato de colesterol o distintos ácidos biliares, evidenciando importantes fallos en la homeostasis del colesterol en el modelo APP/PS1. Una tendencia similar se observó al analizar las muestras de riñón y bazo, con una disminución del contenido total de colesterol y ésteres de colesterol. Asimismo, los niveles de ácidos biliares también se encontraron reducidos en suero e hígado, corroborando la existencia de importantes fallos en las rutas de biosíntesis de estos compuestos. Por el contrario, los perfiles metabólicos de suero, hígado y timo mostraron un aumento significativo de colesterol, lo cual podría sugerir una situación de hiperlipidemia, uno de los factores de riesgo vascular tradicionalmente asociado a la enfermedad de Alzheimer.

Complementariamente, el análisis mediante DI-ESI-MS permitió detectar una acumulación de triglicéridos en suero, riñón, bazo y timo, también indicativo de hiperlipidemia. Sin embargo, las muestras de hígado mostraron una reducción específica de triglicéridos derivados del ácido docosahexaenoico, posiblemente como consecuencia de deficiencias en la biosíntesis de este ácido graso debido a fallos peroxisómicos. Esta concentración anómala de triglicéridos se vio acompañada por una perturbación similar en los niveles de ácidos grasos libres (aumentados en riñón, bazo y timo, disminuidos en hígado, Artículo 16), evidenciando la existencia de mecanismos específicos para la homeostasis lipídica en cada uno de estos órganos.

❖ **Metabolismo energético**

Las alteraciones metabólicas detectadas en todos los compartimentos biológicos investigados del ratón APP/PS1 respaldan los hallazgos descritos

en el Capítulo 2, que relacionan la EA con fallos en numerosas rutas de obtención de energía, como se detalla en la Tabla 11. Sin embargo, en estos trabajos se demuestra que esta situación hipometabólica afecta de forma global tanto al sistema nervioso central como a los órganos periféricos, corroborando el carácter sistémico de este trastorno neurodegenerativo.

En este contexto, cabe destacar las perturbaciones observadas en numerosos intermedios de la glucólisis y la vía de la pentosa fosfato (*e.g.* glucosa, lactato, piruvato, alanina, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato), indicativo de una reducción en el catabolismo de carbohidratos. Además, los cambios observados en los niveles de diversos ácidos orgánicos sugieren importantes déficits en el ciclo de Krebs, probablemente como consecuencia de fallos mitocondriales. Otro marcador de disfunción mitocondrial es la disminución del contenido de carnitina y múltiples acil-carnitinas en todos los tejidos analizados, que podría relacionarse con un metabolismo anormal de lípidos mediante β -oxidación. Sin embargo, las especies derivadas de los ácidos esteárico y oleico se encontraron aumentadas en algunos de estos tejidos, en línea con los resultados previamente descritos para los fosfolípidos. También se detectaron varias alteraciones en los perfiles metabólicos que permitirían relacionar algunos mecanismos patológicos característicos del síndrome metabólico con el desarrollo de la EA en los ratones APP/PS1. En primer lugar, la acumulación de acil-carnitinas de cadena impar (C3/C5) es indicativo de alteraciones en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, lo cual contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Asimismo, el incremento de los niveles renales de sorbitol puede relacionarse con fallos en la ruta de los polialcoholes, una de las perturbaciones metabólicas más importantes de la neuropatía diabética. Por último, la disminución de los niveles de creatina y el aumento de creatinina (excepto en cerebro) corrobora esta situación hipometabólica, ya que ambos metabolitos están implicados en la bioenergética celular a través del sistema ATP-creatina.

Alternativamente, se observó de forma paralela la sobreexpresión de otras rutas de obtención de energía con el fin de compensar estas deficiencias bioenergéticas. Así, la reducción del contenido de cuerpos cetónicos (*i.e.* β -hidroxibutirato, acetoacetato) podría asociarse a una cetogénesis acelerada, mientras que la disminución de los niveles de múltiples aminoácidos en hígado y riñón es indicativo de la sobreexpresión de la gluconeogénesis.

Tabla 11. Alteraciones metabólicas detectadas en suero y otros tejidos biológicos del ratón transgénico APP/PS1 relacionadas con fallos en el metabolismo bioenergético.

	glucólisis	β-oxidación	ciclo de Krebs	sistema creatina-ATP	cetogénesis	ruta de los polialcoholes
suero	↓glucosa, glucosa-6-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, fosfato; ↑lactato	↓carnitina, acil-carnitinas	↓citrato, malato; ↑succinato	↓creatina; ↑creatina	↓β-hidroxi-butilato	-
cerebro	↓glucosa-6-fosfato, pirofosfato, lactato; ↑lactosa, piruvato, alanina	↓carnitina, acil-carnitinas; ↑acil-carnitinas (C3/C5)	↓malato, hidroxi-glutarato	↓creatina	-	-
hígado	↓glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, seudoheptulosa-7-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, lactato, alanina; ↑sacarosa	↓N-metil-lisina, N-trimetil-lisina, acil-carnitinas; ↑acil-carnitinas (C3/C5)	↑succinato, malato	-	↓acetoacetato	-
riñón	↓glucosa, lactato, alanina	↓acil-carnitinas; ↑acil-carnitinas (C3/C5)	↓fumarato, malato	↓creatina; ↑creatina	↓acetoacetato	↑sorbitol
bazo	↓glucosa, ↑lactato	↓acil-carnitinas; ↑acil-carnitinas (C18:1/C18:0)	↑succinato	-	↓acetoacetato	-
timo	↑lactato	↓acil-carnitinas; ↑acil-carnitinas (C3/C5; C18:1/C18:0)	↓malato; ↑succinato	-	-	-

❖ Metabolismo de aminoácidos

La homeostasis de los aminoácidos presenta una elevada complejidad, ya que participan en múltiples rutas bioquímicas dependientes del compartimento biológico considerado. En cerebro, la mayoría de estos aminoácidos están implicados en diversos sistemas de neurotransmisión, muchos de los cuales se ven alterados en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos como la EA. En los trabajos que componen este Capítulo se observó una reducción de glutamato y glicina en las regiones cerebrales primariamente afectadas por el Alzheimer (*i.e.* hipocampo y corteza), así como un incremento de serina, lo cual podría asociarse a fallos en la modulación de los receptores NMDA. Sin embargo, en cerebelo se detectó una tendencia opuesta en los niveles de estos aminoácidos (aumento de glutamato y glicina), mientras que los perfiles metabólicos de estriado mostraron un incremento de glutamato (como en cerebelo), pero las alteraciones en otros co-agonistas de los receptores NMDA concuerdan con los descritos para hipocampo y corteza cerebral. Por lo tanto, podría concluirse que los cambios en la sinapsis mediada por NMDA en respuesta a la EA presentan mecanismos de regulación específicos en cada región cerebral. De forma análoga, los niveles de aspartato y su derivado N-acetil-aspartato también se encontraron disminuidos en las regiones afectadas por una disminución de glutamato (*i.e.* hipocampo, corteza, bulbos olfatorios). Por el contrario, el análisis del cerebelo y estriado demostró un incremento de N-acetil-aspartato, evidenciando la existencia de un metabolismo interrelacionado de estos aminoácidos. Los cambios detectados en los niveles cerebrales de piro-glutamato también permitirían relacionar las alteraciones previamente descritas en otros aminoácidos con una desregulación en los mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica mediada por el ciclo del γ -glutamilo. En este sentido, el contenido de ácido piro-glutámico se vio reducido en la mayoría de regiones cerebrales investigadas, de acuerdo con los perfiles metabólicos de suero de pacientes con EA (Capítulo 2), pero su concentración se vio incrementada en cerebelo, en línea con las alteraciones detectadas en esta región en relación a otros aminoácidos (*e.g.* glutamato, glicina). Por último, también se observó la reducción de otros aminoácidos y compuestos relacionados, como la taurina, histidina, dopamina y tirosina. La taurina juega múltiples papeles en el SNC, participando en procesos de neurotransmisión, neuromodulación y osmoregulación, mientras que la histidina es el aminoácido precursor de la carnosina y la histamina.

Además, la disminución de los niveles de dopamina y su precursor tirosina, principalmente en estriado, podría relacionarse con perturbaciones en el metabolismo de las catecolaminas.

Los perfiles metabolómicos de hígado y riñón mostraron una disminución significativa del contenido total de aminoácidos, indicativo de la sobreexpresión de la ruta de la gluconeogénesis, como se ha descrito en el apartado anterior. Además, las perturbaciones observadas en distintos metabolitos implicados en el ciclo del γ -glutamilo (*e.g.* glutamato, glicina, piro-glutamato, cisteinil-glicina) en todos los órganos periféricos investigados sugieren fallos en la biosíntesis del glutatión. El aumento de los niveles de histidina en bazo y riñón, junto con la acumulación de aspartato y ácido imidazol-acético (sólo en bazo), podría relacionarse con un metabolismo alterado de la histamina. Por el contrario, el contenido de histidina se vio reducido en timo, acompañado por un aumento de ácido urocánico, lo cual podría ser indicativo de un metabolismo diferencial de este aminoácido en este órgano del sistema inmune hacia la producción de ácido glutámico. Por último, la reducción de los niveles de glicina, serina, asparato y treonina en timo, así como el aumento de prolina en bazo también puede contribuir significativamente al desarrollo de la patología de la EA en los ratones APP/PS1, debido a la importancia de estos aminoácidos en el correcto funcionamiento del sistema inmune (*e.g.* crecimiento del timo, proliferación y activación de linfocitos).

Para concluir, hay que destacar que estas perturbaciones observadas en los niveles de múltiples aminoácidos en distintos órganos del ratón APP/PS1 finalmente se vieron reflejadas en los perfiles metabolómicos de las muestras de suero sanguíneo, demostrando el potencial de este fluido biológico para estudiar la patología característica de la EA de forma no invasiva.

❖ Estrés oxidativo

El estrés oxidativo juega un papel primordial en el desarrollo de la EA a nivel tanto central como sistémico, dando lugar a un perfil metabólico caracterizado por la disminución del contenido de diversos compuestos antioxidantes y la acumulación de numerosos productos de oxidación de distintos componentes celulares. En este contexto, el análisis metabolómico de cerebro, suero y tejidos periféricos del ratón APP/PS1 reveló un aumento de múltiples eicosanoides en todas estas matrices, incluyendo prostaglandinas (PG),

leucotrieno B4 (LTB4), ácido hidroxí-eicosa-tetraenoico (HETE) y ácido hidroxí-eicosa-pentaenoico (HEPE), clásicos marcadores de peroxidación lipídica. Como se ha descrito en el apartado anterior, la reducción en los niveles de histidina (suero, cerebro) podría relacionarse con fallos en la síntesis de péptidos antioxidantes, en línea con la disminución observada en el contenido cerebral de homocarnosina. El déficit hepático de glutatión también podría relacionarse con las alteraciones observadas en numerosos aminoácidos y otros compuestos implicados en el ciclo del γ -glutamilo. Además, otros compuestos con propiedades antioxidantes también se vieron disminuidos en distintos órganos periféricos, principalmente hígado, incluyendo ácido ascórbico, retinol y ácido úrico.

❖ Otros mecanismos patológicos

Los perfiles metabólicos de estos tejidos también evidenciaron una degradación acelerada de nucleótidos, con niveles disminuidos de adenosina monofosfato, uridina monofosfato, adenosina monofosfato cíclica y guanosina monofosfato cíclica, así como el incremento de numerosos nucleósidos, bases púricas y pirimidínicas, y bases oxidadas.

La disminución de los niveles de urea en todos los compartimentos biológicos investigados del ratón APP/PS1, junto con la reducción de citrulina en suero y putrescina en timo, así como el incremento de otras poliaminas en cerebro (N-acetil-espermidina) e hígado (espermidina, N-acetil-espermidina), sugiere la existencia de perturbaciones en el metabolismo del nitrógeno a través del ciclo de la urea y la ruta de las poliaminas.

La reducción del contenido sérico de distintas amidas de ácidos grasos y monoglicéridos podría asociarse a perturbaciones en la regulación del sistema endocanabinoide, el cual está implicado en procesos de neurotransmisión y neuromodulación, como ya se ha descrito en el Capítulo 2.

Para concluir, también se detectó la acumulación de varios compuestos exógenos en hígado y riñón (ergotioneína y campesterol), lo cual podría ser indicativo de la existencia de mecanismos mejorados para su asimilación desde la dieta, ya que estos compuestos no se pueden sintetizar en el organismo.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY DATA

DECIPHERING METABOLIC ABNORMALITIES ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE IN SERUM FROM THE APP/PS1 MOUSE MODEL USING INTEGRATED METABOLOMIC APPROACHES

Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza

Table S1. Individual lipid biomarkers identified by UHPLC-MS profiling of serum samples

metabolite	mass (Da)	RT (min)	ion mode	fold change	p value
Bile acids					
Taurocholic acid	515.301	3.08/3.30	N	0.74	0.0423
Taurodeoxycholic acid	499.307	3.22/3.48	N	0.65	0.0416
Deoxycholic acid	392.309	3.92	N	0.46	0.0001
Eicosanoids					
Prostaglandin (series 3)	350.217	3.28	P, N	2.54	0.0001
HEPE	318.212	3.32/3.67	P, N	4.56/7.11	0.0001
Prostaglandin (series 2)	334.221	3.37/3.52	P, N	5.66/4.39	0
Fatty acid amides					
Palmitamide	255.248	3.48	P	0.56	0.0253
Stearamide	283.280	3.80	P	0.39	0.0006
Sphingoid bases					
Hexadecasphinganine	273.257	3.48	P	0.37	0.0011
Phytosphingosine	317.291	3.48	P	0.53	0.0425
Sphinganine	301.289	3.80	P	0.35	0.0014
Lysophospholipids					
LPC(14:0)	467.308	4.32	P, N	0.78	0.0153
LPC(20:5)	541.306	4.33	P, N	0.69	0.0013
LPI(16:0)	572.302	4.35	N	0.81	0.0413
LPI(20:3)	622.323	4.38	N	0.64	0.0111
LPC(18:3)	517.324	4.38	N	0.89	0.0432
LPC(16:1)	493.307	4.47	P, N	0.71	0.0096
LPC(22:6)	567.328	4.60	P	0.82	0.0453
LPC(20:4)	543.331	4.62	P, N	0.75	0.0096
LPC(18:2)	519.336	4.63	P	0.93	0.0458
LPE(16:0)	453.304	4.65	N	0.80	0.0447
LPC(20:3)	545.336	4.92	P, N	0.67	0.0125
LPC(22:5)	569.337	4.95	P, N	0.71	0.0069
LPC(18:1)	521.358	5.12	P, N	0.76	0.0074
Phospholipids					
PI(16:0/20:4)	858.527	7.62	N	0.60	0.0249
PC(16:1/20:5)	777.526	8.08	P	0.78	0.0437
PE(16:0/20:4)	739.523	8.08	N	0.67	0.0458
PPE(18:0/20:3)	753.562	8.13	P	0.77	0.0458
PE(18:1/22:6)	789.532	8.13	N	0.68	0.0117
PC(16:1/22:6)	803.556	8.15	N	0.63	0.0436
PC(20:4/22:6)	853.548	8.18	P	0.67	0.0324
PE(18:1/20:4)	765.544	8.18	N	0.69	0.0363
PI(18:0/20:3)	888.590	8.22	N	0.28	0.0203

PC(16:1/20:4)	779.533	8.23	P, N	0.51	0.0154
PI(20:4/20:0)	914.609	8.30	N	0.62	0.0412
PC(16:1/18:2)	755.563	8.32	N	0.63	0.0472
PE(20:4/20:0)	795.582	8.37	P	0.75	0.0236
PC(20:3/20:3)	833.583	8.38	P	0.71	0.0213
PE(18:0/20:3)	769.552	8.48	P	0.87	0.0472
PC(16:1/16:0)	731.534	8.50	P	0.78	0.0457
PC(18:1/22:6)	831.561	8.52	P	0.83	0.0453
PC(18:1/20:4)	807.555	8.57	P	0.69	0.0333
PE(18:1/18:0)	745.549	8.77	P	0.78	0.0487
PPC(18:0/20:4)	793.581	8.88	P	0.80	0.0468
PC(16:0/18:0)	761.588	8.95	P, N	0.76	0.0452
PPC(18:0/18:0)	773.599	9.23	P	0.76	0.0476
PC(18:0/20:3)	811.609	9.25	N	0.66	0.0436
PC(18:0/20:2)	813.635	9.60	N	0.58	0.0441
Sphingomyelins					
SM(d18:1/18:0)	730.585	8.85	P	0.92	0.0476
SM(d18:0/22:0)	788.659	9.52	P	0.97	0.0453
SM(d18:1/23:1)	798.646	9.68	P	0.81	0.0469
SM(d18:1/22:0)	786.681	9.82	N	0.74	0.0432
SM(d18:1/24:1)	812.662	9.88	P	0.93	0.0483
SM(d18:1/23:0)	800.659	10.13	P	0.94	0.0468
SM(d18:1/24:0)	814.701	10.38	N	0.73	0.0453

Abbreviations: *HEPE*: hydroxyl-eicosapentaenoic acid, *LPC*: lyso-phosph-ocholine, *LPI*: lyso-phosphoinositol, *LPE*: lyso-phosphoethanolamine, *PI*: phosphoinositol, *PC*: phosphocholine, *PE*: phosphoethanolamine, *PPE*: plasmylethanolamine, *PPC*: plasmylethanolamine, *SM*: sphingomyelin, *P*: positive mode, *N*: negative mode.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Coefficient of signal variation within APP/PS1, WT and QC groups for phospholipids and related compounds identified as potential markers for discrimination.

metabolite	%CV (APP/PS1)	%CV (WT)	%CV (QC)
LYSO-PHOSPHOLIPIDS			
LPC(16:0)	19.6	12.7	5.5
LPC(18:1)	32.9	17.4	7.9
LPC(18:0)	11.6	24.3	5.3
PHOSPHOLIPIDS			
PE(16:0/18:1)	29.8	29.9	16.4
PE(16:0/18:0)	40.1	23.3	19.5
PC(16:1/16:0)	47.8	27.4	11.0
PC(16:0/16:0)	22.9	16.9	5.1
PE(16:1/20:4)	25.3	28.3	6.6
PPE(18:1/20:4)	10.9	16.0	10.6
PC(16:0/18:2)	14.3	19.9	3.4
PC(16:0/18:1)	20.9	14.3	3.7
PC(16:0/18:0)	13.0	11.1	5.6
PE(18:1/20:4)	11.1	10.6	3.9
PPE(18:1/22:6)	14.9	7.9	3.9
PC(16:0/20:4)	11.3	7.6	2.5
PC(18:2/18:0)	13.3	14.4	6.6
PC(18:1/18:0)	13.9	9.2	7.7
PE(18:1/22:6)	13.3	11.1	6.0
PC(16:0/22:6)	11.9	16.3	1.8
PC(18:1/20:4)	13.8	14.0	2.4
PC(18:1/22:6)	25.7	28.1	6.2
PC(18:0/22:6)	13.6	16.8	5.7
PC(18:0/22:5)	15.4	13.3	5.6
CATABOLIC METABOLITES			
choline	40.4	30.1	8.5
phosphocholine	19.6	20.5	6.3
GPE	30.8	32.1	12.8
GPC	34.9	26.2	8.1

Abbreviations: *LPC*, lyso-phosphocholine; *PE*, phosphoethanolamine; *PC*, phosphocholine; *PPE*, plasmenylethanolamine; *GPE*, glycerophosphoethanolamine; *GPC*, glycerophosphocholine.

Table S2. Coefficient of signal variation within APP/PS1, WT and QC groups for fatty acids and related compounds identified as potential markers for discrimination.

metabolite	%CV (APP/PS1)	%CV (WT)	%CV (QC)
FREE FATTY ACIDS			
palmitoleic acid	36.7	44.1	7.0
palmitic acid	43.2	38.6	2.4
linolenic acid	43.3	34.9	12.3
linoleic acid	50.3	39.2	3.2
oleic acid	48.7	44.9	1.5
arachidonic acid	41.4	31.9	2.7

docosahexaenoic acid	40.2	35.2	2.5
ACYLCARNITINES			
C2-CAR	29.6	34.2	7.5
C3-CAR	31.0	38.2	8.3
C4-CAR	33.4	50.1	9.8
C5-CAR	23.4	19.8	7.9
C4-OH-CAR	48.6	38.3	7.0
C6-CAR	45.0	43.7	10.3
C6-OH-CAR	19.4	26.9	10.2
C8-CAR	44.1	43.8	13.7
C12-CAR	41.5	18.9	10.6
C14:1-CAR	23.3	27.8	12.3
C14:0-CAR	15.7	12.6	8.6
C16:1-CAR	37.7	30.8	7.5
C16:0-CAR	31.3	33.9	6.9
C18:1-CAR	40.9	45.9	5.5
C18:0-CAR	38.1	42.9	6.2
EICOSANOIDS			
HEPE	28.4	30.0	12.6
HETE	40.1	52.4	12.0
prostaglandin	17.8	21.7	14.7

Abbreviations: CAR, carnitine; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid.

Table S3. Coefficient of signal variation within APP/PS1, WT and QC groups for other lipids identified as potential markers for discrimination.

metabolite	%CV (APP/PS1)	%CV (WT)	%CV (QC)
DIACYLGLYCEROLS			
DAG(16:0/18:3)	29.4	19.6	12.1
DAG(16:0/18:2)	53.7	31.7	7.2
DAG(16:0/18:1)	48.4	34.4	6.3
DAG(18:3/18:1)	46.6	33.6	6.1
DAG(18:2/18:1)	33.8	31.5	11.6
DAG(18:1/18:1)	38.1	40.2	5.8
DAG(18:3/22:6)	50.6	48.6	3.8
DAG(18:3/22:6)	42.8	35.6	5.8
TRIACYLGLYCEROLS			
TAG(14:0/16:0/18:2)	45.8	34.2	4.0
TAG(14:0/16:0/18:1)	46.2	29.6	2.2
TAG(16:0/16:0/16:0)	40.9	33.1	4.1
TAG(16:1/16:1/18:2)	43.7	28.7	2.6
TAG(16:1/16:0/18:2)	40.7	24.3	1.1
TAG(16:0/16:0/18:2)	33.3	18.1	1.1
TAG(16:0/16:0/18:1)	30.6	19.3	3.1
TAG(16:0/16:0/18:0)	29.3	19.5	2.4
TAG(16:0/18:3/18:2)	49.4	33.7	1.2
TAG(16:0/18:2/18:2)	41.9	21.5	1.0
TAG(16:0/18:2/18:1)	32.2	13.2	1.0

TAG(16:0/18:1/18:1)	35.3	21.7	1.1
TAG(16:0/18:1/18:0)	37.9	30.4	1.5
TAG(18:3/18:2/18:2)	38.2	35.1	4.0
TAG(18:2/18:2/18:2)	36.3	24.9	2.9
TAG(18:2/18:2/18:1)	38.9	20.7	1.3
TAG(18:2/18:1/18:1)	42.5	31.1	1.0
TAG(18:1/18:1/18:1)	44.7	41.4	0.6
TAG(18:1/18:1/18:0)	37.7	39.5	0.9
TAG(16:0/18:1/22:6)	39.8	20.7	2.2
TAG(16:0/18:0/22:6)	29.7	17.3	3.5
TAG(16:0/18:2/22:0)	22.9	25.8	2.4
TAG(16:0/18:1/22:0)	29.9	18.4	3.1
TAG(18:2/18:1/22:6)	46.8	26.0	5.4
TAG(18:1/18:1/22:6)	39.9	22.5	3.7
TAG(18:1/18:0/22:6)	33.0	28.7	5.5
STEROIDS			
cholesterol	53.0	36.6	19.5
deoxycholic acid	54.9	42.3	21.4
taurodeoxycholic acid	54.5	40.0	16.7
taurocholic acid	33.5	30.9	8.8
CE(16:0)	30.7	42.0	8.1
CE(18:2)	41.5	22.2	4.6
CE(18:1)	49.2	53.4	1.9
CE(20:4)	40.7	18.9	8.0

Abbreviations: DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol; CE, cholesteryl ester.

Table S4. Coefficient of signal variation within APP/PS1, WT and QC groups for low molecular weight metabolites identified as potential markers for discrimination.

metabolite	%CV (APP/PS1)	%CV (WT)	%CV (QC)
AMINO ACIDS			
proline	21.5	25.3	9.4
threonine	18.0	18.2	6.8
aspartic acid	18.9	13.3	14.1
glutamine	18.6	14.7	7.8
glutamic acid	34.0	31.3	6.2
histidine	37.9	52.3	5.3
N-methyllysine	26.9	31.8	9.2
N-trimethyllysine	19.2	25.9	10.2
ENERGY-RELATED METABOLITES			
acetoacetic acid	16.5	17.1	1.3
creatinine	37.0	28.6	8.6
fumaric acid	19.5	15.1	3.7
succinic acid	15.5	16.8	0.8
creatine	15.4	19.7	8.8
malic acid	34.3	25.7	12.3
glucose	23.7	13.7	3.9
sorbitol	14.9	15.3	14.5
glucose-6-phosphate	31.5	27.1	10.1

sucrose	24.3	17.7	3.3
NUCLEOTIDES METABOLITES			
cytosine	41.7	56.3	7.4
uracil	15.1	18.9	8.5
adenine	30.6	24.8	6.3
hypoxanthine	21.6	22.7	5.0
xanthine	25.6	18.3	6.5
FAPy-adenine	33.7	28.9	9.7
uric acid	14.7	11.9	2.3
uridine	24.3	32.9	2.7
adenosine	49.7	26.5	4.2
inosine	33.5	24.5	10.4
UMP	54.4	34.5	3.8
cGMP	35.3	20.8	2.6
AMP	47.3	55.7	3.3
OTHERS			
urea	53.8	33.0	16.2
hypotaurine	52.5	28.6	6.5
betaine	34.9	51.6	4.8
taurine	19.4	32.1	6.8
pyroglutamic acid	29.8	26.8	7.6
urocanic acid	40.5	50.4	14.4
spermidine	49.5	38.1	9.8
ascorbic acid	14.2	14.4	1.4
hippuric acid	35.3	54.5	5.4
N-acetylspermidine	33.2	27.3	21.4
ergothioneine	31.3	46.8	19.5
retinol	49.7	52.9	20.3
glutathione	29.1	26.1	5.2

Abbreviations: UMP, uridine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; AMP, adenosine monophosphate.

CAPÍTULO 5

ESTUDIO METABOLÓMICO DE LA COMPONENTE INFLAMATORIA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL MODELO TRANSGÉNICO APP/PS1/IL4-KO

Artículo 19. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic research on the role of interleukin-4 in Alzheimer's disease. *Metabolomics* (aceptado).

Capítulo 5

El artículo "*Metabolomic research on the role of interleukin-4 in Alzheimer's disease*" que forma parte del Capítulo 5 ha sido retirado de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dicho artículo ha sido sustituido por la referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU), enlace a la revista y resumen.

- González Domínguez, R., García Barrera, T., Vitorica, J., Gómez Ariza, J.L.: "*Metabolomic research on the role of interleukin-4 in Alzheimer's disease*". *Metabolomics*. Vol. 11, n. 5, págs. 1175-1183, (2015). DOI: 10.1007/s11306-015-0773-z

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://dx.doi.org/10.1007/s11306-015-0773-z>

RESUMEN:

Inflammation plays a prominent role in the pathogenesis of Alzheimer's disease, affecting both brain and the peripheral system. Thus, modulation of inflammation in animal models of this neurodegenerative disorder may be of great interest to elucidate the pathological mechanisms underlying this inflammatory component. To this end, a metabolomic investigation on a triple transgenic mouse model obtained by crossing the APP/PS1 mice with interleukin-4 knockout mice (a model of impaired immune function) was performed for the first time. Serum samples from transgenic mice and wild type animals were analyzed by direct infusion mass spectrometry followed by multivariate statistics in order to identify altered metabolites. Subsequently, metabolic pathway analysis allowed the elucidation of potential pathological mechanisms associated with the development of Alzheimer-type disorders in response to interleukin-4 deficiency, such as impaired homeostasis of histamine, altered metabolism of amino acids (threonine, aspartate and tyrosine), deregulated urea cycle and increased production of eicosanoids. Therefore, this work demonstrates the potential of this triple transgenic model with modulated immunity for the study of pathological mechanisms associated with inflammation in Alzheimer's disease

En base a los resultados obtenidos en los trabajos incluidos en Capítulos anteriores de esta Tesis, la patología de la enfermedad de Alzheimer podría relacionarse estrechamente con numerosos procesos inflamatorios y fallos en el sistema inmune, con importantes repercusiones tanto en el sistema nervioso central como a nivel sistémico. Por ello, tras investigar los mecanismos patológicos asociados a la EA y su progresión desde el DCL, y posteriormente demostrar la implicación de diversos compartimentos biológicos en el desarrollo de este trastorno neurodegenerativo (*i.e.* cerebro, suero sanguíneo, órganos periféricos) mediante el empleo de ratones transgénicos APP/PS1, en este Capítulo se describe la aplicación de una plataforma metabolómica basada en DI-ESI-MS con el fin de caracterizar las alteraciones metabólicas asociadas a los procesos inflamatorios propios de la EA. Con este propósito, se hizo uso de un nuevo modelo transgénico de función inmune deteriorada basado en el cruce de los ratones APP/PS1 e IL4-KO (ver sección 1.4.3, Introducción).

Los perfiles metabolómicos de suero sanguíneo de animales control, APP/PS1 y APP/PS1/IL4-KO mostraron diferencias significativas en los niveles de 13 metabolitos, incluyendo aminoácidos (treonina, ácido aspártico, tirosina), eicosanoides (prostaglandinas, HEPE, LTB4) y otros compuestos (urea, citrulina, histamina, 1-metil-histamina, ácido urocánico, dopamina). La mayoría de estos compuestos discriminantes se encontraron alterados en muestras tanto de ratones APP/PS1 como APP/PS1/IL4-KO, pero no mostraron diferencias significativas entre estas dos líneas transgénicas. Sin embargo, cabe destacar que algunos de estos metabolitos sufrieron un cambio gradual entre los tres grupos de estudio, como se representa en la Figura 19, de modo que estas alteraciones metabólicas podrían relacionarse con el desarrollo de la patología característica de la EA en el modelo APP/PS1 y su agravamiento en respuesta a la depleción del gen IL-4.

La reducción de los niveles séricos de histamina y ácido urocánico, junto con el incremento de 1-metil-histamina, denota profundos fallos en el sistema histaminérgico, en línea con los resultados obtenidos mediante análisis metabolómico de los órganos del sistema inmune del ratón APP/PS1 (Capítulo 4). Este déficit de histamina puede tener importantes repercusiones en el desarrollo de la EA, ya que este compuesto está implicado en la respuesta inflamatoria frente a patógenos mediante la producción de citoquinas y presenta actividad neurotransmisora. Además, la reducción del

contenido de histamina se vio ligeramente acentuada en suero de los ratones APP/PS1/IL4-KO (Figura 19), probablemente como consecuencia de la interconexión del metabolismo de la histamina y la interleucina 4 a través de la inmunoglobulina E.

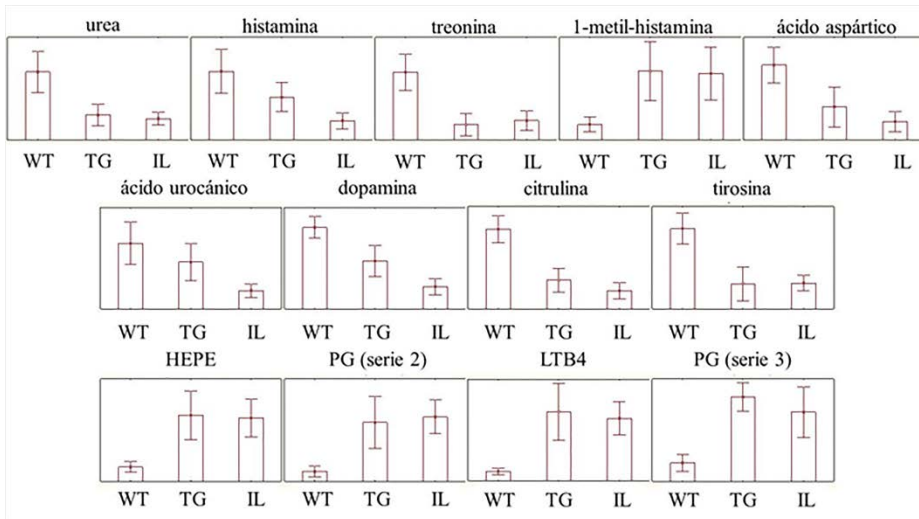


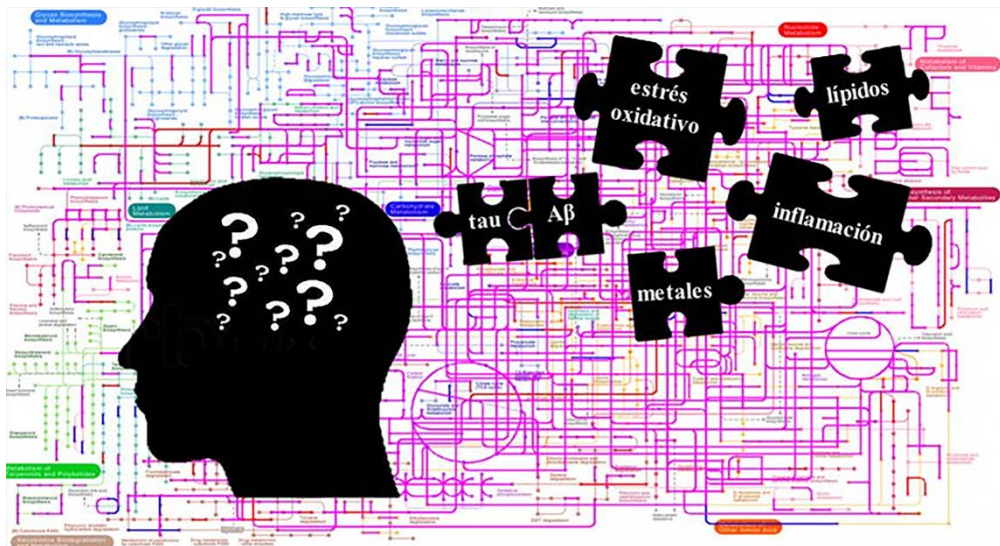
Figura 19. Diagramas de barras con intervalos de confianza (95%) para los metabolitos discriminantes identificados mediante DI-ESI-MS en suero de ratones APP/PS1 (TG) y APP/PS1/IL4-KO (IL).

El análisis de estas muestras de suero también reveló la disminución de múltiples aminoácidos y otros compuestos relacionados en ambas líneas transgénicas (treonina, aspartato, tirosina, dopamina), de forma análoga a las perturbaciones descritas en timo de APP/PS1 (Capítulo 4), lo cual podría ser indicativo de una función inmune deteriorada, ya que estos metabolitos juegan un papel prominente en el correcto funcionamiento del sistema inmune (*e.g.* crecimiento del timo, proliferación y activación de linfocitos, actividad fagocítica).

Como se ha descrito en Capítulos anteriores, la reducción del contenido de urea y otros metabolitos implicados en la homeostasis del nitrógeno, como la citrulina, podría relacionarse con una situación de hiperamonemia derivada de la existencia de deficiencias en los mecanismos de detoxificación de amonio en la EA. Sin embargo, la concentración de estos metabolitos fue inferior en suero de APP/PS1/IL4-KO que en APP/PS1, evidenciando que la depleción de IL-4 puede agravar estas perturbaciones en el ciclo de la urea.

Para concluir, también se detectó un considerable aumento de algunos eicosanoides en suero de estos ratones transgénicos, incluyendo ácido hidroxieicosa-pentaenoico, prostaglandinas y leucotrieno B₄. La acumulación de estos mediadores pro-inflamatorios puede asociarse a la liberación y posterior oxidación de ácidos grasos poliinsaturados debido a la sobre-activación de fosfolipasas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de estos productos de peroxidación lipídica entre ambos modelos transgénicos, evidenciando que la interleucina 4 no juega un papel relevante en la producción de eicosanoides en la patogénesis de la EA.

Conclusiones - Conclusions



1. Las plataformas metabolómicas basadas en análisis directo mediante espectrometría de masas que se han optimizado en esta Tesis (DI-ESI-MS, FIA-APPI-MS) presentan un gran potencial para realizar un primer *screening* metabólico de múltiples fluidos y tejidos biológicos, gracias a su amplia cobertura analítica, reducido tiempo de análisis y simplicidad instrumental.
2. La combinación de plataformas metabolómicas complementarias basadas en el acoplamiento de técnicas de separación ortogonales y posterior detección mediante espectrometría de masas permite llevar a cabo una investigación más exhaustiva de la totalidad del metaboloma (RP-UHPLC-MS: compuestos de baja polaridad, principalmente lípidos; GC-MS: metabolitos de bajo peso molecular; CE-MS: compuestos altamente polares e iónicos).
3. La aplicación de estas técnicas metabolómicas permitió detectar numerosas alteraciones metabólicas en suero sanguíneo asociadas a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y su progresión desde el deterioro cognitivo leve, demostrando la elevada complejidad de la etiología subyacente a este desorden neurodegenerativo. Entre estos mecanismos patológicos, cabe destacar un metabolismo anormal lípidos de membrana, fallos en diversos sistemas de neurotransmisión, déficits en el metabolismo bioenergético, o estrés oxidativo, entre otros.
4. El análisis metabolómico de múltiples compartimentos biológicos del ratón transgénico APP/PS1 (*i.e.* suero, cerebro, órganos periféricos) permitió investigar de forma global los mecanismos patológicos asociados al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.
5. Los perfiles metabolómicos de suero de pacientes de Alzheimer y ratones APP/PS1 mostraron grandes similitudes, demostrando el potencial de este modelo transgénico en el estudio de la enfermedad de Alzheimer.
6. El análisis comparativo de distintas regiones cerebrales demostró que las áreas más afectadas por la neuropatología característica de la enfermedad de Alzheimer en el ratón APP/PS1 son el hipocampo y la corteza cerebral, aunque otras regiones también se vieron perturbadas en menor medida, incluyendo el estriado, cerebelo y bulbos olfatorios. Además, cabe destacar que algunos metabolitos mostraron tendencias opuestas dependiendo de la

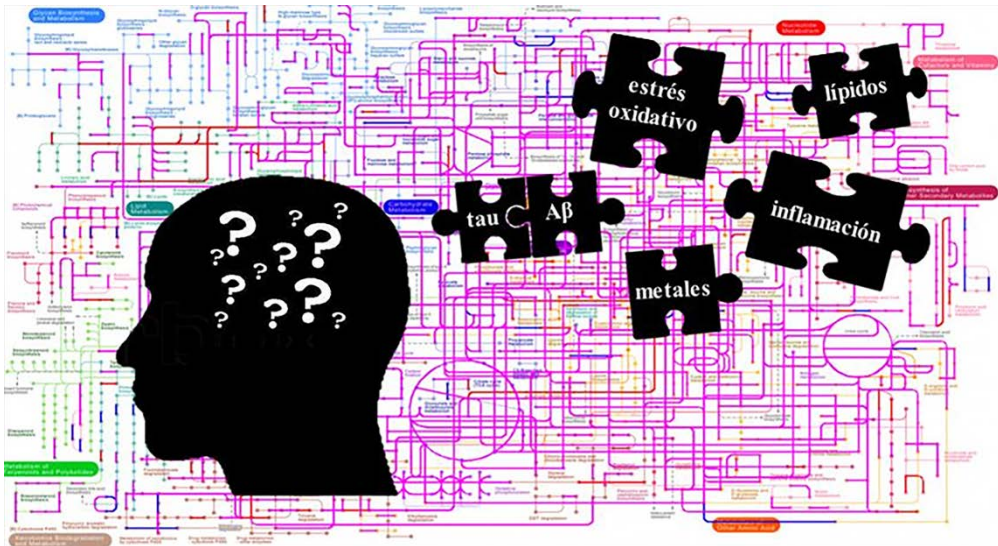
región investigada, evidenciando la existencia de perturbaciones regionales específicas.

7. Los perfiles metabolómicos de hígado, riñón, bazo y timo mostraron cambios significativos en los niveles de múltiples metabolitos, muchos de los cuales son comunes a los ya descritos en suero y cerebro, confirmando la naturaleza sistémica de este trastorno neurodegenerativo.
8. La aplicación de técnicas metabolómicas en muestras de suero de ratones transgénicos APP/PS1 y APP/PS1/IL4-KO permitió estudiar las alteraciones metabólicas subyacentes a los procesos inflamatorios relacionadas con la enfermedad de Alzheimer.
9. Se optimizó un procedimiento metalómico basado en el fraccionamiento de las metalo-especies presentes en suero sanguíneo según su peso molecular mediante precipitación de proteínas en condiciones no desnaturalizantes y posterior análisis en ICP-MS.
10. Los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve mostraron un perfil metalómico anómalo, caracterizado por el aumento de los niveles séricos de aluminio, cobre y otros metales en la fracción de bajo peso molecular, así como por la disminución del contenido total de hierro, zinc, manganeso y selenio. Además, los estudios de correlación demostraron la existencia de mecanismos interrelacionados en la homeostasis de estos elementos metálicos.

1. Metabolomic platforms optimized in this Thesis based on direct mass spectrometry analysis (DI-ESI-MS, FIA-APPI-MS) present a great potential to perform a first metabolic screening in multiple biological fluids and tissues, due to its wide metabolome coverage, reduced analysis time and instrumental simplicity.
2. The combination of complementary metabolomic platforms based on the coupling of orthogonal separation techniques and subsequent detection by mass spectrometry allows performing a more comprehensive investigation of the entire metabolome (RP-UHPLC-MS: low polarity compounds, mainly lipids; GC-MS: low molecular weight metabolites; CE-MS: highly polar and ionic compounds).
3. The application of these metabolomic approaches allowed the detection of numerous metabolic alterations in blood serum associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease and its progression from mild cognitive impairment, demonstrating the high complexity of the etiology underlying this neurodegenerative disorder. These pathological mechanisms include an abnormal metabolism of membrane lipids, failures in different neurotransmitter systems, deficits in bio-energetic metabolism, or oxidative stress, among others.
4. Metabolomic analysis of multiple biological compartments from the APP/PS1 transgenic mice (*i.e.* serum, brain, peripheral organs) allowed performing a holistic investigation about pathological mechanisms associated with the development of Alzheimer's disease.
5. Serum metabolomic profiles of Alzheimer's patients and APP/PS1 mice were very similar, demonstrating the potential of this transgenic model for studying Alzheimer's disease.
6. Comparative analysis of different brain regions showed that the areas most affected by the characteristic neuropathology of Alzheimer's disease in the APP/PS1 mouse are hippocampus and cortex, although other regions were also disrupted to a lesser extent, including the striatum, cerebellum and olfactory bulbs. Furthermore, it is noteworthy that some metabolites showed opposite trends depending on the region investigated, evidencing the existence of region-specific perturbations.
7. Metabolomic profiles of liver, kidney, spleen and thymus showed significant changes in levels of multiple metabolites, common to those previously described in serum and brain, corroborating the systemic nature of this neurodegenerative disorder.

- 8.** The application of metabolomic techniques in serum samples from APP/PS1 and APP/PS1/IL4-KO transgenic mice allowed studying metabolic alterations underlying to inflammatory processes related to Alzheimer's disease.
- 9.** We optimized a metallomic approach based on the fractionation of metallo-species present in blood serum according to the molecular mass by means of protein precipitation in non-denaturing conditions and subsequent ICP-MS analysis.
- 10.** Patients affected by Alzheimer's disease and mild cognitive impairment showed an abnormal metallomic profile, characterized by increased serum levels of aluminum, copper and other metals in the low molecular weight fraction, as well as decreased total content of iron, zinc, manganese and selenium. Furthermore, correlation studies demonstrated the existence of inter-related mechanisms in the homeostasis of these elements.

Bibliografía



- [1] Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-Gerichtliche Medizin (Berlin) 64:146-148.
- [2] Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. (1995). An english translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". Clinical Anatomy 8:429-431.
- [3] Kraepelin E. (1910). Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Barth, Leipzig.
- [4] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. Nat Rev Neurol 7:137-152.
- [5] Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. Neurology 53:1992-1997.
- [6] Feulner TM, Laws SM, Friedrich P, Wagenpfeil S, Wurst SH, Riehle C, Kuhn KA, Krawczak M, Schreiber S, Nikolaus S, Förstl H, Kurz A, Riemenschneider M. (2010). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. Mol Psychiatry 15:756-766.
- [7] Förstl H, Kurz A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 249:288-290.
- [8] Petersen RC. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. J Intern Med 256:183-194.
- [9] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. Lancet 368:387-403.
- [10] Morris JK, Honea RA, Vidoni ED, Swerdlow RH, Burns JM. (2014). Is Alzheimer's disease a systemic disease? Biochim Biophys Acta 1842:1340-1349.
- [11] Bettens K, Slegers K, Van Broeckhoven C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. Lancet Neurol 12:92-104.
- [12] Kim J, Basak JM, Holtzman DM. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Neuron 63:287-303.

- [13] Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- [14] Mokhtar SH, Bakhuraysah MM, Cram DS, Petratos S. (2013). The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *Int J Alzheimers Dis* 2013:910502.
- [15] Walsh DM, Selkoe DJ. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.
- [16] Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HW, De Bruijn C. (2002). Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging* 23:485-508.
- [17] Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Dausgs ID, Kuo YM, Emmerling MR, Soares H, Quinn JF, Kaye J, Connor DJ, Silverberg NB, Adler CH, Seward JD, Beach TG, Sabbagh MN. (2009). A β peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 5:18-29.
- [18] Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:198-210.
- [19] Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-147.
- [20] Tuppo EE, Arias HR. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- [21] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. (2012). A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal* 2012:756357.
- [22] Aiyaz M, Lupton MK, Proitsi P, Powell JF, Lovestone S. (2012). Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease. *Immunobiology* 217:204-215.
- [23] Frisardi V, Panza F, Seripa D, Farooqui T, Farooqui AA. (2011). Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A

complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog Lipid Res* 50:313-330.

[24] Lee KS, Chung JH, Choi TK, Suh SY, Oh BH, Hong CH. (2009). Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:281-287.

[25] Town T, Tan J, Flavell RA, Mullan M. (2005). T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 7:255-264.

[26] Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. (2004). Autoimmune responses to amyloid structures of A β (25–35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dem Geriatr Cogn Disord* 18:165-171.

[27] Baril L, Nicolas L, Croisile B, Crozier P, Hessler C, Sassolas A, McCormick JB, Trannoy E. (2004). Immune response to A β -peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neurosci Lett* 355:226-230.

[28] Markesbery WR. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134-147.

[29] Cervellati C, Cremonini E, Bosi C, Magon S, Zurlo A, Bergamini CM, Zuliani G. (2013). Systemic oxidative stress in older patients with mild cognitive impairment or late onset Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10:365-372.

[30] Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Conrad CC, Gracy RW. (2002). Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1566-1570.

[31] Praticò D. (2010). The neurobiology of isoprostanes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:930-933.

[32] Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, Lee SJ, Lee C, Paik IH, Lee CU. (2006). Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 21:344-348.

[33] Squitti R. (2012). Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. *Front Biosci* 17:451-472.

- [34] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158:47-52.
- [35] Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE. (1994). Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265:1464-1467.
- [36] Hesse L, Beher D, Masters CL, Multhaup G. (1994). The β A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett* 349:109-116.
- [37] Egaña JT, Zambrano C, Nuñez MT, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. (2003). Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. *Biometals* 16:215-223.
- [38] Zhou LX, Du JT, Zeng ZY, Wu WH, Zhao YF, Kanazawa K, Ishizuka Y, Nemoto T, Nakanishi H, Li YM. (2007). Copper (II) modulates in vitro aggregation of a tau peptide. *Peptides* 28:2229-2234.
- [39] Perry G, Cash AD, Srinivas R, Smith MA. (2002). Metals and oxidative homeostasis in Alzheimer's disease. *Drug Develop Res* 56:293-299.
- [40] Valko M, Morris H, Cronin MTD. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161-1208.
- [41] Jomova K, Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65-87.
- [42] Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ. (1973). Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180:511-513.
- [43] Tomljenovic L. (2011). Aluminum and Alzheimer's disease: After a century of controversy, is there a plausible link? *J Alzheimers Dis* 23:567-598.
- [44] Loef M, Schrauzer GN, Walach H. (2011). Selenium and Alzheimer's disease: A systematic review. *J Alzheimers Dis* 26:81-104.
- [45] Cuajungco MP, Fagét KY. (2003). Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 41:44-56.
- [46] McKahn G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-

ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34:939-944.

[47] Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B. (2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol* 14:e1-e26.

[48] Reiman EM, Jagust WJ. (2012). Brain imaging in the study of Alzheimer's disease. *NeuroImage* 61:505-516.

[49] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-746.

[50] Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC.(2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56:1143-1153.

[51] Ward M. (2007). Biomarkers for Alzheimer's disease. *Expert Rev Mol Diagn* 7:635-646.

[52] Patel S, Shah RJ, Coleman P, Sabbagh M. (2011). Potential peripheral biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:572495.

[53] Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. (2009). Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 35:128-140.

[54] Anderson DC. (2013). Alzheimer's disease biomarkers: more than molecular diagnostics. *Drug Develp Res* 74:92-111.

[55] Zürbig P, Jahn H. (2012). Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research. *Electrophoresis* 33:3617-3630.

[56] McGonigle P, Ruggeri B. (2014). Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* 87:162-171.

[57] Van Dam D, De Deyn PP. (2011). Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 164:1285-1300.

- [58] Braidy N, Muñoz P, Palacios AG, Castellano-Gonzalez G, Inestrosa NC, Chung RS, Sachdev P, Guillemin GJ. (2012). Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *J Neural Transm* 119:173-195.
- [59] Trushina E, Mielke MM. (2014). Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1232-1239.
- [60] Hall AM, Roberson ED. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 88:3-12.
- [61] Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- [62] Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. (1996). Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710-713.
- [63] Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402-405.
- [64] Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet* 13:159-170.
- [65] Malm T, Koistinaho J, Kanninen K. (2011). Utilization of APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice in research of Alzheimer's disease: Focus

on gene therapy and cell-based therapy applications. *Int J Alzheimers Dis* 2011:517160.

[66] Chen SQ, Cai Q, Shen YY, Wang PJ, Teng GJ, Zhang W, Zang FC. (2012). Age-related changes in brain metabolites and cognitive function in APP/PS1transgenic mice. *Behav Brain Res* 235:1-6.

[67] Birch AM, Katsouri L, Sastre M. (2014). Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 11:25

[68] Frenkel D, Wilkinson K, Zhao L, Hickman SE, Means TK, Puckett L, Farfara D, Kingery ND, Weiner HL, El Khoury J. (2013). Scar1 deficiency impairs clearance of soluble amyloid-beta by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression. *Nat Comm* 4:2030.

[69] Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S. (2010). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20816-20821.

[70] Jin JJ, Kim HD, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. (2008). Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 5:23.

[71] Naert G, Rivest S. (2011). CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:6208-6220.

[72] Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, Wegner A, Mair F, Schipke CG, Peters O, Winter Y, Becher B, Heppner FL. (2012). Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med* 18:1812-1819.

[73] He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y. (2007). Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol* 178:829-841.

[74] Colton CA, Vitek MP, Wink DA, Xu Q, Cantillana V, Previti ML, Van Nostrand WE, Weinberg JB, Dawson H. (2006). NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12867-12872.

- [75] Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. (2012), Interleukin-4: A cytokine to remember. *Immunol* 189:4213-4219.
- [76] Kühn, R., K. Rajewsky, W. Müller. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254:707-710.
- [77] Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-248.
- [78] Ribizzi G, Fiordoro S, Barocci S, Ferrari E, Megna M. (2010). Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations, *Neurol Sci* 31:321-325.
- [79] Li W, Qian X, Teng H, Ding Y, Zhang L. (2014). Association of interleukin-4 genetic polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease in Chinese Han population. *Neurosci Lett* 563:17-21.
- [80] Reale M, Iarlori C, Feliciani C, Gambi D. (2008). Peripheral chemokine receptors, their ligands, cytokines and Alzheimer's disease, *J Alzheimer's Dis* 14:147-159.
- [81] Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. (2010). CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP + PS1 bigenic mice. *FASEB J* 24:3093-3102.
- [82] Kawahara K, Suenobu M, Yoshida A, Koga K, Hyodo A, Ohtsuka H, Kuniyasu A, Tamamaki N, Sugimoto Y, Nakayama H. (2012). Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces beta-amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience* 207:243-260.
- [83] Fiehn O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155-171.
- [84] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* 40:387-426.

- [85] Beecher CWW. (2003). The Human Metabolome, in: Harrigan GG, Goodacre R (Eds.), *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis*, Springer, New York.
- [86] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. (1999). "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopy data. *Xenobiotica* 29:1181-1189.
- [87] Bundy JG, Davey MP, Viant MR. (2009). Environmental metabolomics : a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5:3-21.
- [88] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. (2004). Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 4:189-199.
- [89] Ellis DI, Goodacre R. (2006). Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst* 131:875-885.
- [90] Fancy SA, Beckonert O, Darbon G, Yabsley W, Walley R, Baker D, Perkins GL, Pullen FS, Rumpel K. (2006). Gas chromatography/flame ionisation detection mass spectrometry for the detection of endogenous urine metabolites for metabonomic studies and its use as a complementary tool to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2271-2280.
- [91] Pan Z, Raftery D. (2007). Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 387:525-527.
- [92] Barba I, Fernandez-Montesinos R, Garcia-Dorado D, Pozo D. (2008). Alzheimer's disease beyond the genomic era: nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy-based metabolomics. *J Cell Mol Med* 12:1477-1485.
- [93] Dettmer K, Aronov AP, Hammock BD.(2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 26:51-78.
- [94] Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS. (2011). The human serum metabolome. *PLoS One* 6:e16957.

- [95] Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart DS. (2013). The human urine metabolome. *PLoS One* 8:e73076.
- [96] Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncic K, Xiong Y, Cheng D, Eisner R, Gautam B, Tzur D, Sawhney S, Bamforth F, Greiner R, Li L. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871:164-173.
- [97] Sugimoto M, Ikeda S, Niigata K, Tomita M, Sato H, Soga T. (2012). MMBDB: Mouse Multiple Tissue Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 40:D809-D814.
- [98] Broadhurst DI, Kell DB. (2006). Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* 2:171-196.
- [99] Vuckovic D. (2012). Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 403:1523-1548.
- [100] Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. (2012). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics* 75:1079-1088.
- [101] Römisch-Margl W, Prehn C, Bogumil R, Röhring C, Suhre K, Adamski J. (2012). Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics* 8:133-142.
- [102] Michopoulos F, Lai L, Gika H, Theodoridis G, Wilson I. (2009). UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction, *J Proteome Res* 8:2114-2121.
- [103] Idborg-Bjorkman H, Edlund P, Kvalheim OM, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. (2003). Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis. *Anal Chem* 75:4784-4792.
- [104] Namera A, Yamamoto S, Saito T, Miyazaki S, Oikawa H, Nakamoto A, Nagao M. (2011). Simultaneous extraction of acidic and basic drugs from

urine using mixed-mode monolithic silica spin column bonded with octadecyl and cation-exchange group. *J Sep Sci* 34:2232-2239.

[105] Fernández-Peralbo MA, Luque de Castro MD. (2012). Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC-Trends Anal Chem* 41:75-85.

[106] Koek MM, Jellema RH, van der Greef J, Tas AC, Hankemeier T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics* 7:307-328.

[107] Koek MM, Muilwijk B, vander Werf MJ, Hankemeier T. (2006). Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 78:1272-1281.

[108] Xiayan L, Legido-Quigley C. (2008). Advances in separation science applied to metabolomics. *Electrophoresis* 29:3724-3736.

[109] Kuehnbaum NL, Britz-McKibbin P. (2013). New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chem Rev* 113:2437-2468.

[110] Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, Plumb RS. (2005). High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res* 4:591-598.

[111] Barbas C, Moraes EP, Villaseñor A. (2011). Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 55:823-831.

[112] Xie G, Su M, Li P, Gu X, Yan C, Qiu Y, Li H, Jia W. (2007). Analysis of urinary metabolites for metabolomic study by pressurized CEC. *Electrophoresis* 28:4459-4468.

[113] Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. (2009). CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* 30:276-291.

[114] Draper J, Lloyd AJ, Goodacre R, Beckmann M. (2013). Flow infusion electrospray ionisation mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting: a review. *Metabolomics* 9:S4-S29.

- [115] Huang MZ, Cheng SC, Cho YT, Shiea J. (2011). Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Anal Chim Acta* 702:1-15.
- [116] Cai SS, Syage JA. (2006). Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Anal Chem* 78:1191-1199.
- [117] An Z, Chen Y, Zhang R, Song Y, Sun J, He J, Bai J, Dong L, Zhan Q, Abliz Z. (2010). Integrated ionization approach for RRLC-MS/MS-based metabolomics: finding potential biomarkers for lung cancer. *J Proteome Res* 9:4071-4081.
- [118] Tian H, Bai J, An Z, Chen Y, Zhang R, He J, Bi X, Song Y, Abliz Z. (2013). Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:2071-2080.
- [119] Boernsen KO, Gatzek S, Imbert G. (2005). Controlled protein precipitation in combination with chip-based nanospray infusion mass spectrometry. An approach for metabolomics profiling of plasma. *Anal Chem* 77:7255-7264.
- [120] Robb DB, Blades MW. (2008). State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *AnalChimActa* 627:34-49.
- [121] Kauppila TJ, Kuuranne T, Meurer EC, Eberlin MN, Kotiaho T, Kostianen R. (2002). Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal Chem* 74:5470-5479.
- [122] Kauppila TJ, Kostianen R, Bruins AP. (2004). Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:808-815.
- [123] Robb DB, Smith DR, Blades MW. (2008). Investigation of substituted-benzene dopants for charge exchange ionization of nonpolar compounds by atmospheric pressure photoionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 19:955-963.
- [124] Robb DB, Blades MW. (2005). Effects of solvent flow, dopant flow, and lamp current on dopant-assisted atmospheric pressure photoionization

(DA-APPI) for LC-MS. Ionization via proton transfer, *J Am Soc Mass Spectrom* 16:1275-1290.

[125] Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G. (2007). From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *J Proteome Res* 6:459-468.

[126] Weaver PJ, Lares AMF, Wolff JC. (2007). Investigation of the advanced functionalities of a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:2415-2421.

[127] Katajamaa M, Oresic M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A* 1158:318-328.

[128] van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7:142.

[129] Hrydziusko O, Viant MR. (2012). Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics* 8:S161-S174.

[130] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. (2007). Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res* 6:469-479.

[131] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial, *Metabolomics* 9:280-299.

[132] Pulfer M, Murphy RC. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* 22:332-364.

[133] Haynes CA, Allegood JC, Park H, Sullards MC. (2009). Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:2696-2708.

[134] Liebisch G, Binder M, Schifferer R, Langmann T, Schulz B, Schmitz G. (2006). High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta* 1761:121-128.

[135] Murphy RC, Leiker TJ, Barkley RM. (2011). Glycerolipid and cholesterol ester analyses in biological samples by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1811:776-783.

- [136] Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TWM, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reilly MD, Thaden JT, Viant MR. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3:211-221.
- [137] Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, Vervoort J. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends Anal Chem* 26:855-866.
- [138] Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A* 1353:99-105.
- [139] Sangster T, Major H, Plumb R, Wilson AJ, Wilson ID. (2006). A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *Analyst* 131:1075-1078.
- [140] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R. (2007). Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 24:1962-1973.
- [141] Kantarci K, Weigand SD, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Gunter J, Reyes D, Shiung M, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack CR Jr. (2007). Longitudinal 1H MRS changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:1330-1339.
- [142] Watanabe T, Shiino A, Akiguchi I. (2012). Hippocampal metabolites and memory performances in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 97:289-293.
- [143] Marjanska M, Curran GL, Wengenack TM, Henry PG, Bliss RL, Poduslo JF, Jack Jr CR, Ugurbil K, Garwood M. (2005). Monitoring disease progression in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11906-11910.
- [144] Oberg J, Spenger C, Wang FH, Andersson A, Westman E, Skoglund P, Sunnemark D, Norinder U, Klason T, Wahlund LO, Lindberg M. (2008). Age related changes in brain metabolites observed by 1H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 29:1423-1433.

- [145] Botosoa EP, Zhu M, Marbeuf-Gueye C, Triba MN, Dutheil F, Duyckäerts C, Beaune P, Lorient MA, Le Moye L. (2012). NMR metabolomic of frontal cortex extracts: First study comparing two neurodegenerative diseases, Alzheimer disease and amyotrophic lateral sclerosis. *IRBM* 33:281-286.
- [146] Inoue K, Tsutsui H, Akatsu H, Hashizume Y, Matsukawa N, Yamamoto T, Toyo'oka T. (2013). Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains. *Sci Rep* 3:2364.
- [147] Graham SF, Chevallier OP, Roberts D, Holscher C, Elliot CT, Green BD. (2013). Investigation of the human brain metabolome to identify potential markers for early diagnosis and therapeutic targets of Alzheimer's disease. *Anal Chem* 85:1803-1811.
- [148] Graham SF, Holscher C, Green BD. (2014). Metabolic signatures of human Alzheimer's disease (AD): ¹H NMR analysis of the polar metabolome of post-mortem brain tissue. *Metabolomics* 10:744-753.
- [149] Kork F, Holthues J, Hellweg R, Jankowski V, Tepel M, Öhring R, Heuser I, Bierbrauer J, Peters O, Schlattmann P, Zidek W, Jankowski J. (2009). A possible new diagnostic biomarker in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 6:519-524.
- [150] Jukarainen NM, Korhonen SP, Laakso MP, Korolainen MA, Niemitz M, Soininen PP, Tuppurainen K, Vepsäläinen J, Pirttila T, Laatikainen R. (2008). Quantification of ¹H NMR spectra of human cerebrospinal fluid: a protocol based on constrained total-line-shape analysis. *Metabolomics* 4:150-160.
- [151] Ibañez C, Simo C, Barupal DK, Fiehn O, Kivipelto M, Cedazo-Mínguez A, Cifuentes A. (2013). A new metabolomic workflow for early detection of Alzheimer's disease. *J Chromatogr. A* 1302:65-71.
- [152] Myint KT, Aoshima K, Tanaka S, Nakamura T, Oda Y. (2009). Quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nanoliquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 81:1121-1129.
- [153] Kaddurah-Daouk R, Rozen S, Matson W, Han X, Hulette CM, Burke JR, Doraiswamy PM, Welsh-Bohmer KA. (2011). Metabolomic changes in autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:309-317.

- [154] Kaddurah-Daouk R, Zhu H, Sharma S, Bogdanov M, Rozen SG, Matson W, Oki NO, Motsinger-Reif AA, Churchill E, Lei Z, Appleby D, Kling MA, Trojanowski JQ, Doraiswamy PM, Arnold SE, Pharmacometabolomics Research Network. (2013). Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 3:e244.
- [155] Motsinger-Reif AA, Zhu H, Kling MA, Matson W, Sharma S, Fiehn O, Reif DM, Appleby DH, Doraiswamy PM, Trojanowski JQ, Kaddurah-Daouk R, Arnold SE. (2013). Comparing metabolomic and pathologic biomarkers alone and in combination for discriminating Alzheimer's disease from normal cognitive aging. *Acta Neuropathol Commun* 1:28.
- [156] Czech C, Berndt P, Busch K, Schmitz O, Wiemer J, Most V, Hampel H, Kastler J, Senn H. (2012). Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS ONE* 7:e31501.
- [157] Ibáñez C, Simó C, Martín-Álvarez PJ, Kivipelto M, Winblad B, Cedazo-Mínguez A, Cifuentes A. (2012). Toward a predictive model of Alzheimer's disease progression using capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics. *Anal Chem* 84:8532-8540.
- [158] Greenberg N, Grassano A, Thambisetty M, Lovestone S, Legido-Quigley C. (2009). A proposed metabolic strategy for monitoring disease progression in Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 30:1235-1239.
- [159] Li NJ, Liu, WT, Li W, Li SQ, Chen XH, Bi KS, He P. (2010). Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem* 43:992-997.
- [160] Armirotti A, Basit A, Realini N, Caltagirone C, Bossù P, Spalletta G, Piomelli D. (2014). Sample preparation and orthogonal chromatography for broad polarity range plasma metabolomics: application to human subjects with neurodegenerative dementia. *Anal Biochem* 455:48-54.
- [161] Oresic M, Hyötyläinen T, Herukka SK, Sysi-Aho M, Mattila I, Seppänen-Laakso T, Julkunen V, Gopalacharyulu PV, Hallikainen M, Koikkalainen J, Kivipelto M, Helisalmi S, Lötjönen J, Soininen H. (2011). Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 1:e57.
- [162] Wang G, Zhou Y, Huang FJ, Tang HD, Xu XH, Liu JJ, Wang Y, Deng YL, Ren RJ, Xu W, Ma JF, Zhang YN, Zhao AH, Chen SD, Jia W. (2014).

Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Proteome Res* 13:2649-2658.

[163] Trushina E, Dutta T, Persson XM, Mielke MM, Petersen RC. (2013). Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. *PLoS One* 8:e63644.

[164] Cui Y, Liu X, Wang M, Liu L, Sun X, Ma L, Xie W, Wang C, Tang S, Wang D, Wu Q. (2014). Lysophosphatidylcholine and amide as metabolites for detecting alzheimer disease using ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based metabonomics. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:954-963.

[165] Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Shankle WR, Tomita M. (2013). Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis* 34:2865-2872.

[166] Forster DM, James MF, Williams SR. (2012). Effects of Alzheimer's disease transgenes on neurochemical expression in the mouse brain determined by ¹H MRS in vitro. *NMR Biomed* 25:52-58.

[167] Piro JR, Benjamin DI, Duerr JM, Pi YQ, Gonzales C, Wood KM, Schwartz JW, Nomura DK, Samad TA. (2012). A dysregulated endocannabinoid-eicosanoid network supports pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep* 1:617-623.

[168] Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, Siddiqui A, Tamura Y, Sesaki H, Wengenack TM, Dzeja PP, Poduslo JF. (2012). Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 7:e32737.

[169] Lin S, Liu H, Kanawati B, Liu L, Dong J, Li M, Huang J, Schmitt-Kopplin P, Cai Z. (2013). Hippocampal metabolomics using ultrahigh-resolution mass spectrometry reveals neuroinflammation from Alzheimer's disease in CRND8 mice. *Anal Bioanal Chem* 405:5105-5117.

[170] Wang H, Lian K, Han B, Wang Y, Kuo SH, Geng Y, Qiang J, Sun M, Wang M. (2014). Age-related alterations in the metabolic profile in the

hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone 8: a spontaneous Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis* 39:841-848.

[171] Dedeoglu A, Choi JK, Cormier K, Kowall NW, Jenkins BG. (2004). Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res* 1012:60-65.

[172] Balayssac S, Déjean S, Lalande J, Gilard V, Malet-Martino M. (2013). A toolbox to explore NMR metabolomic data sets using the R environment. *Chemometr Intell Lab* 126:50-59.

[173] Lin S, Kanawati B, Liu L, Witting M, Li M, Huang J, Schmitt-Kopplin P, Cai Z. (2014). Ultra high resolution mass spectrometry-based metabolic characterization reveals cerebellum as a disturbed region in two animal models. *Talanta* 118:45-53.

[174] Salek RM, Xia J, Innes A, Sweatman BC, Adalbert R, Randle S, McGowan E, Emson PC, Griffin JL. (2010). A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 56:937-943.

[175] Woo DC, Lee SH, Lee DW, Kim SY, Kim GY, Rhim HS, Choi CB, Kim HY, Lee CU, Choe BY. (2010). Regional metabolic alteration of Alzheimer's disease in mouse brain expressing mutant human APP-PS1 by ¹H HR-MAS. *Behav Brain Res* 211:125-131.

[176] Lalande J, Halley H, Balayssac S, Gilard V, Déjean S, Martino R, Francés B, Lassalle JM, Malet-Martino M. (2014). ¹H NMR metabolomic signatures in five brain regions of the A β PPswe Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease at four ages. *J Alzheimers Dis* 39:121-143.

[177] Graham SF, Holscher C, McClean P, Elliott CT, Green BD. (2013) ¹H NMR metabolomics investigation of an Alzheimer's disease (AD) mouse model pinpoints important biochemical disturbances in brain and plasma. *Metabolomics* 9:974-983.

[178] Hu ZP, Browne ER, Liu T, Angel TE, Ho PC, Chan ECY. (2012). Metabonomic profiling of TASTPM transgenic alzheimer's disease mouse model. *J Proteome Res* 11:5903-5913.

- [179] Jiang N, Yan X, Zhou W, Zhang Q, Chen H, Zhang Y, Zhang X. (2008). NMR-based metabonomic investigations into the metabolic profile of the senescence-accelerated mouse. *J Proteome Res* 7:3678-3686.
- [180] Fukuhara K, Ohno A, Ota Y, Senoo Y, Maekawa K, Okuda H, Kurihara M, Okuno A, Niida S, Saito Y, Takikawa O. (2013). NMR-based metabolomics of urine in a mouse model of Alzheimer's disease: identification of oxidative stress biomarkers. *J Clin Biochem Nutr* 52:133-138.
- [181] Peng J, Guo K, Xia J, Zhou J, Yang J, Westaway D, Wishart DS, Li L. (2014). Development of isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for mouse urine metabolomics: quantitative metabolomic study of transgenic mice related to Alzheimer's disease. *J Proteome Res* 13:4457-4469.
- [182] Han X. (2010). Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and the altered lipids at the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1801:774-783.
- [183] Han X, M Holtzman D, McKeel DW Jr, Kelley J, Morris JC. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818.
- [184] Han X. (2007). Potential mechanisms contributing to sulfatide depletion at the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: a tale of shotgun lipidomics. *J Neurochem* 103:171-179.
- [185] Cheng H1, Zhou Y, Holtzman DM, Han X. (2010). Apolipoprotein E mediates sulfatide depletion in animal models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:1188-1196.
- [186] Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, Welsh-Bohmer KA, Doraiswamy PM, Kaddurah-Daouk R. (2011). Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS ONE* 6:e21643.
- [187] Grimm MO, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T. (2011). From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in

Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:7713-7722.

[188] Kosicek M, Kirsch S, Bene R, Trkanjec Z, Titlic M, Bindila L, Peter-Katalinic J, Hecimovic S. (2010). Nano-HPLC-MS analysis of phospholipids in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients--a pilot study. *Anal Bioanal Chem* 398:2929-2937.

[189] Sato Y1, Nakamura T, Aoshima K, Oda Y. (2010). Quantitative and wide-ranging profiling of phospholipids in human plasma by two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 82:9858-9864.

[190] Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 35:1305-1312.

[191] Wisniewski T, Newman K, Javitt NB. (2013). Alzheimer's disease: brain desmosterol levels. *J Alzheimers Dis* 33:881-888.

[192] Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 45:186-193.

[193] Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y. (2012). Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res* 53:567-576.

[194] Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, Wenk MR, Shui G, Di Paolo G. (2012). Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287:2678-2688.

[195] Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Okuno A, Mikawa R, Niida S, Takikawa O, Saito Y. (2013). Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis* 12:68.

[196] Yao JK, Wengenack TM, Curran GL, Poduslo JF. (2009). Reduced membrane lipids in the cortex of Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurochem Res* 34:102-108.

- [197] Fabelo N, Martín V, Marín R, Santpere G, Aso E, Ferrer I, Díaz M. (2012). Evidence for premature lipid raft aging in APP/PS1 double-transgenic mice, a model of familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:868-881.
- [198] Williams RJP. (2001). Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev* 216-217:583-595.
- [199] Haraguchi H. (2004). Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom* 19:5-14.
- [200] Lobinski R, Becker JS, Haraguchi H, Sarkar B. (2010). Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 82:493-504.
- [201] Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. (2009). Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev* 38:1119-1138.
- [202] Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. (2010). Inductively-coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *Eur J Mass Spectrom* 16:243-253.
- [203] Issaq HJ. (2001). The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* 22:3629-3638.
- [204] Jakubowski N, Lobinski R, Moens L. (2004). Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. *J Anal At Spectrom* 19:1-4.
- [205] Scopes RK. (1994). Protein purification: principles and practice, Springer Advanced Texts in Chemistry, N.Y., pp. 85-92.
- [206] Simpson RJ. (2004). Purifying proteins for proteomics: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., pp. 721-722.
- [207] Gao Y, Chen C, Chai Z F. (2007). Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. *J Anal At Spectrom* 22:856-866.
- [208] Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD. (1998). Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology* 19:339-345.

- [209] Rao JKS, Rao RV, Shanmugavelu P, Menon RB. (1999). Trace elements in Alzheimer's disease brain: a new hypothesis. *Alzheimers Rep* 2:241-246.
- [210] Rao KSJ, Shanmugavelu P, Shankar SK, Devi RPR, Rao RV, Pande S, Menon RB. (1999). Trace elements in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Alzheimers Rep* 2:333-338.
- [211] Basun H, Forssell LG, Wetterberg L, Winblad B. (1991). Metals and trace-elements in plasma and cerebrospinal-fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement* 3:231-258.
- [212] Bocca B, Forte G, Petrucci F, Pino A, Marchione F, Bomboi G, Senofonte O, Giubilei F, Alimonti A. (2005). Monitoring of chemical elements and oxidative damage in patients affected by Alzheimer's disease. *Ann Ist Super Sanita* 41:197-203.
- [213] Alimonti A, Ristori G, Giubilei F, Stazi MA, Pino A, Visconti A, Brescianini S, Sepe Monti M, Forte G, Stanzione P, Bocca B, Bomboi G, D'Ippolito C, Annibali V, Salvetti M, Sancesario G. (2007). Serum chemical elements and oxidative status in Alzheimer's disease, Parkinson disease and multiple sclerosis. *Neurotoxicology* 28:450-456.
- [214] Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. (2010). Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol* 24:169-173.
- [215] Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Aguilar MV, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, González-Muñoz MJ, de Bustos F, Porta J, Ortí-Pareja M, Zurdo M, Barrios E, Martínez-Para MC. (1998). Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105:479-488.
- [216] Kovatsi L, Touliou K, Tsolaki M, Kazis A. (2006). Cerebrospinal fluid levels of calcium, magnesium, copper and zinc in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Trace Elem Electroly* 23:247-250.
- [217] Baum L, Chan IH, Cheung SK, Goggins WB, Mok V, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Zee BC, Cheng W, Chan MH, Szeto S, Lui V, Tsoh J, Bush AI, Lam CW, Kwok T. (2010). Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. *Biometals* 23:173-179.

- [218] Smorgon C, Mari E, Atti AR, Dalla Nora E, Zamboni PF, Calzoni F, Passaro A, Fellin R. (2004). Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 9:393-402.
- [219] Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chioventa P, Rossi L, Cortesi M, Cassetta E, Rossini PM. (2002). Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 59:1153-1161.
- [220] Kozłowski H, Janicka-Kłos A, Brasun J, Gaggelli E, Valensin D, Valensin G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coord Chem Rev* 253:2665-2685.
- [221] Yokel RA. (2006). Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10:223-253.
- [222] Rivera-Mancía S, Ríos C, Montes S. (2011). Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *Biometals* 24:811-825.
- [223] Andrási E, Farkas E, Scheibler H, Réffy A, Bezúr L. (1995). Al, Zn, Cu, Mn and Fe levels in brain in Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 21:89-97.
- [224] Srivastava RAK, Jain JC. (2002). Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's disease brain. *J Neurol Sci* 196:45-52.
- [225] Gerhardsson L, Lundh T, Minthon L, Londos E. (2008). Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25:508-515.
- [226] Bocca B, Alimonti A, Bomboi G, Giubilei F, Forte G. (2006). Alterations in the level of trace metals in Alzheimer's disease. *Trace Elem Electroly* 23:270-276.
- [227] Jolly DH, PointrinalP, Millart H, Kariger E, Blanchard F, Collery P, Choisy H. (1993). Blood zinc, magnesium, calcium, aluminum and manganese concentrations in patients, with or without Alzheimer-type dementia. *Trace Elem Med* 10:192-195.
- [228] Zatta P, Cervellin D, Mattiello G, Gerotto M, Lazzari F, Gasparoni G, Gomirato L, Mazzolini G, Scarpa G, Zanoboni V, Pilone G, Favarato M.

- (1993). Plasma multielemental analysis in Alzheimer's disease and multi-infarctual dementia. *Trace Elem Med* 10:85-89.
- [229] Omar RA, Chyan YJ, Andorn AD, Poeggeler B, Robakis NK, Pappolla MA. (1999). Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1:139-145.
- [230] Vural H, Sirin B, Yilmaz N, Eren I, Delibas N. (2009). The role of arginine–nitric oxide pathway in patients with Alzheimer disease. *Biol Trace Elem Res* 129:58-64.
- [231] Cutts DA, Maguire RP, Stedman JD, Leenders KL, Spyrou NM. (1999). A comparative study in Alzheimer's and normal brains of trace element distribution using PIXE and INA analyses and glucose metabolism by positron emission tomography. *Biol Trace Elem Res* 71:541-549.
- [232] Stedman JD, Spyrou NM. (1997). Elemental analysis of the frontal lobe of "normal" brain tissue and that affected by Alzheimer's disease. *J Radioanal Nucl Chem* 217:163-166.
- [233] Leite RE, Jacob-Filho W, Saiki M, Grinberg LT, Ferretti RE. (2008). Determination of trace elements in human brain tissues using neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem* 278:581-584.
- [234] Cardoso BR, Ong TP, Jacob-Filho W, Jaluul O, Freitas MI, Cozzolino SM. (2010). Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *Br J Nutr* 103:803-806.
- [235] Giacoppo S, Galuppo M, Calabrò RS, D'Aleo G, Marra A, Sessa E, Bua DG, Potortì AG, Dugo G, Bramanti P, Mazzon E. (2014). Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study. *Biol Trace Elem Res* 161:151-160.
- [236] Duce JA, Bush AI. (2010). Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol* 92:1-18.
- [237] Gong G, O'Bryant SE. (2010). The arsenic exposure hypothesis for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24:311-316.
- [238] Mutter J, Curth A, Naumann J, Deth R, Walach H. (2010). Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. *J Alzheimers Dis* 22:357-374.

- [239] Webster WS, Valois AA. (1981). The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:247-257.
- [240] Costa L, Fox D. (1983). A selective decrease of cholinergic muscarinic receptors in the visual cortex of adult rats following developmental lead exposure. *Brain Res* 276:259-266.
- [241] Zapatero MD, de Jalon AG, Pascual F, Calvo ML, Escanero J, Marro A. (1995). Serum aluminum levels in Alzheimer's disease and other senile dementias. *Biol Trace Elem Res* 47:235-240.
- [242] Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao YX, Vance DE. (1988). Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 9:1-7.
- [243] Bujak R, García-Álvarez A, Rupérez FJ, Nuño-Ayala M, García A, Ruiz-Cabello J, Fuster V, Ibáñez B, Barbas C. (2014). Metabolomics reveals metabolite changes in acute pulmonary embolism. *J Proteome Res* 13:805-816.
- [244] Naz S, Garcia A, Rusak M, Barbas C. (2013). Method development and validation for rat serum fingerprinting with CE-MS: application to ventilator-induced-lung-injury study. *Anal Bioanal Chem* 405:4849-4858.
- [245] Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, Knowles J, HUSERMET Consortium, Goodacre R, Kell DB. (2009). Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum. *Anal Chem* 81:7038-7046.
- [246] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78:779-787.
- [247] Veselkov KA, Vingara LK, Masson P, Robinette SL, Want E, Li JV, Barton RH, Boursier-Neyret C, Walther B, Ebbels TM, Pelczer I, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. (2011). Optimized preprocessing of ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry urinary metabolic profiles for improved information recovery. *Anal Chem* 83:5864-5872.

- [248] Bligh EG, Dyer WJ. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 37:911-917.
- [249] Zhao Z, Xu Y. (2010). An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *J Lipid Res* 51:652-659.
- [250] Murphy RC, Leiker TJ, Barkley RM. (2011). Glycerolipid and cholesterol ester analyses in biological samples by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1811:776-783.
- [251] Xia J, Wishart DS. (2010). MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics* 26:2342-2344.

PUBLICACIONES PRESENTADAS

Artículo 1. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem* 406:7137-7148.

Factor de impacto: 3.58

Artículo 2. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2012). Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry. *Chem Papers* 66:829-835.

Factor de impacto: 1.19

Artículo 3. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 98:321-326.

Factor de impacto: 2.83

Artículo 4. Raúl González-Domínguez, Rocío Castilla-Quintero, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry. *Anal Biochem* 465:20-27.

Factor de impacto: 2.30

Artículo 5. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Application of a novel metabolomics approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease. *Talanta* 131:480-489.

Factor de impacto: 3.51

Artículo 6. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics* 104:37-47.

Factor de impacto: 3.93

Artículo 7. Raúl González-Domínguez, Francisco Javier Rupérez, Tamara García-Barrera, Coral Barbas, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic-driven

elucidation of pathological mechanisms associated with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* (enviado).

Factor de impacto: 3.80

Artículo 8. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal* 107:75-81.

Factor de impacto: 2.83

Artículo 9. Raúl González-Domínguez, Antonia García, Tamara García-Barrera, Coral Barbas, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 35:3321-3330.

Factor de impacto: 3.16

Artículo 10. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* 9:292-300.

Factor de impacto: 3.98

Artículo 11. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. *Biometals* 27:539-549.

Factor de impacto: 2.69

Artículo 12. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Application of metabolomics based on direct mass spectrometry analysis for the elucidation of altered metabolic pathways in serum from the AAPP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal* 107:378-385.

Factor de impacto: 2.83

Artículo 13. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Deciphering metabolic abnormalities associated with Alzheimer's disease in serum from the APP/PS1 mouse model using integrated metabolomics approaches. *Biochimie* 110:119-128.

Factor de impacto: 3.12

Artículo 14. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. (2015). Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 102:425-435.

Factor de impacto: 2.83

Artículo 15. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. (2014). Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta: Mol Basis Dis* 1842:2395-2402.

Factor de impacto: 5.09

Artículo 16. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. High throughput multi-organ metabolomics in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Electrophoresis* (aceptado).

Factor de impacto: 3.16

Artículo 17. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model. *Mol Biosystems* (enviado).

Factor de impacto: 3.18

Artículo 18. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomics reveals significant impairments in the immune system of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 36:577-587.

Factor de impacto: 3.16

Artículo 19. Raúl González-Domínguez, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, José Luis Gómez-Ariza. Metabolomic research on the role of interleukin-4 in Alzheimer's disease. *Metabolomics* (aceptado).

Factor de impacto: 3.96

