

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y  
ANALÍTICA**

Programa de Doctorado Química Física y Analítica

**Síntesis de levadura enriquecida en azufre  $^{34}\text{S}$  y su  
aplicación en estudios clínicos y metabólicos**

**TESIS DOCTORAL**

**Oscar Galilea San Blas**

**Oviedo, 2016**

---

---



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Síntesis de levadura enriquecida en azufre 34 y su aplicación en estudios clínicos y metabólicos	Inglés: Synthesis of 34 sulfur enriched yeast and its application in clinical and metabolic studies

<b>2.- Autor</b>	
Nombre: OSCAR GALILEA SAN BLAS	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: QUIMICA FISICA Y ANALITICA	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA Y ANALITICA	

### RESUMEN (en español)

La búsqueda de nuevos biomarcadores de enfermedades en general y tumores malignos en particular es uno de los grandes campos de investigación clínica. De los diferentes tejidos y fluidos que pueden ser objeto de análisis, la orina constituye una muestra ideal para la monitorización de estas sustancias dado que no requiere de métodos invasivos. Además, los perfiles metabólicos en orina están siendo objeto de investigación para desarrollar nuevos ensayos clínicos basados en este tipo de biomarcadores.

Por otro lado, las técnicas híbridas que combinan potentes técnicas de separación cromatográficas o electroforéticas con la espectrometría de masas en general y la espectrometría de masas con fuente ICP en particular abre la posibilidad de nuevas estrategias analíticas dentro de este campo.

En nuestro caso, basándonos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos evaluado la posibilidad de utilizar las medidas de relaciones isotópicas de azufre en los metabolitos presentes en la orina como método para detectar pacientes con determinadas patologías como por ejemplo cáncer de próstata. La hipótesis fue la siguiente: al suministrar una dosis de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$  a un individuo sano y a un paciente, si el metabolismo de estos individuos es diferente como consecuencia de la enfermedad, debería observarse la aparición de un enriquecimiento isotópico en azufre diferente en algunos de los metabolitos de azufre presentes en la orina de estos individuos. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue evaluar si esto es así o no, ya que en caso afirmativo estos metabolitos podrían proponerse como posibles biomarcadores de la enfermedad.

#### 1- Síntesis de levadura enriquecida en azufre 34

En primer lugar se procedió a sintetizar levadura *Saccharomyces Cerevisiae* enriquecida en azufre 34. Para ello se partió de la experiencia previa en nuestro grupo de investigación en este campo, pero modificando y optimizando algunos aspectos de los métodos anteriormente desarrollados con objeto de obtener un enriquecimiento mayor en el isótopo 34 del azufre. Esta levadura se empleó en los estudios posteriores.

Por otro lado, se preparó un patrón de metionina enriquecida isotópicamente a partir de la levadura sintetizada, con objeto de utilizarla en la determinación de metionina en muestras de interés clínico. En este sentido, se ha puesto a punto un método para la determinación de metionina en suero humano mediante dilución isotópica HPLC-ICP-MS. Este método fue validado comparando los resultados obtenidos por nuestro método con los del HUCA utilizando un método alternativo.



## **2. Desarrollo de una metodología analítica cuantitativa para la monitorización de metabolitos de azufre en orina**

Era esperable que los enriquecimientos isotópicos de azufre en los metabolitos presentes en la orina tras una dosis única de levadura enriquecida fuesen muy pequeños. Para poder detectar diferencias entre individuos sanos y enfermos es necesario utilizar técnicas que alcancen una alta precisión en la medida de relaciones isotópicas. Por ello, se han comparado dos equipos ICP-MS de doble enfoque, uno con detección secuencial y otro con detección simultánea, fundamentalmente en lo que se refiere a la precisión en la medida de relaciones isotópicas. Los resultados mostraron una clara ventaja del equipo multicolector midiendo relaciones isotópicas de azufre con los SEM a bajas concentraciones o con las copas de Faraday a concentraciones elevadas.

Por otro lado, se ha desarrollado un método HPLC para separar los principales metabolitos de azufre en orina, comparando diferentes tipos de cromatografía resultando la cromatografía de fase reversa la que permitía la separación de un mayor número de metabolitos. Además, se utilizó un novedoso sistema de desolvatación que permitía utilizar altas concentraciones de disolvente orgánico en las fases móviles.

Finalmente con objeto de cuantificar el azufre endógeno y exógeno presente en cada pico cromatográfico, se añadía en continuo un flujo post-columna de azufre  $^{33}$  enriquecido y se aplicó la herramienta matemática de IPD.

## **3. Evaluación del enriquecimiento isotópico de azufre en orina de animales de laboratorio tras suministrarles una dosis de levadura enriquecida.**

Se realizaron estudios tanto en ratas Wistar como en ratones C57 tras administrarles una dosis de levadura enriquecida en  $^{34}$ S. Los primeros estudios revelaron que la marca isotópica se podía observar en compuestos de azufre excretados en la orina, encontrándose a las 12 horas el máximo de este enriquecimiento.

Posteriormente, se realizaron estudios entre ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata para buscar diferencias en el enriquecimiento de azufre entre estas dos poblaciones. Un primer estudio reveló ciertas diferencias en animales sanos y enfermos en un estadio avanzado de la enfermedad. Por ello, se realizó un segundo estudio de los diferentes estadios de la enfermedad durante 40 semanas. Se observaron diferencias entre las poblaciones de ratones sanos y enfermos, desde estadios iniciales, utilizando para el tratamiento de datos técnicas quimiométricas, tanto en lo que se refiere a la identificación de los compuestos que presentaban un comportamiento distinto en ambas poblaciones, como para establecer diferencias globales entre las mismas.

### **RESUMEN (en Inglés)**

The search of new biomarkers for general diseases and malignant tumors in particular, is one of the big fields in clinical investigation. Of the different tissues and fluids that can be analyzed, the urine is an ideal sample for these substances monitoring because non-invasive methods are required. Besides, the metabolomics profiles in urine are under investigation to develop new clinical trials based on such biomarkers.

On the other hand, the hybrid techniques that combine chromatographic or electrophoretic powerful separation techniques with the general mass spectrometry and in particular with ICP mass spectrometry open the possibility of new analytical strategies in this field.

In our case, based on previous studies carried out in our laboratory, we have evaluated the possibility of using the sulfur isotopic ratios measurements in the urine metabolites as a method



to detect patients with certain pathologies such as prostate cancer. The hypothesis was the following: providing a dose of  $^{34}\text{S}$  enriched yeast to a healthy subject and to a patient, if the metabolism of these subjects is different as a disease consequence, it should be observed the appearance of a different sulfur isotopic enrichment in some sulfur metabolites presented in the urine of these subjects. The main objective of this thesis was to assess whether this is so or not, because if so these metabolites could be proposed as potential biomarkers of disease.

### **1-Synthesis of $^{34}\text{S}$ sulfur enriched yeast**

First, we proceeded to synthesized  $^{34}\text{S}$  sulfur enriched *Saccharomyces Cerevisiae* yeast. For that, we started from the previous experience in our research group in this field, but modifying and optimizing some aspects of the methods previously developed to obtain a higher degree in sulfur  $^{34}$  enrichment. This yeast was employed in later studies.

On the other hand, an isotopically enriched methionine solution was prepared from the synthesized yeast, in order to use it in the methionine determination in samples of clinical interest. In this sense, a method was optimized for the methionine determination in serum samples through isotopic dilution HPLC-ICP-MS. This method was validated comparing the result obtained by our method with the HUCA's results obtained using an alternative method.

### **2- Develop of an analytical quantitative methodology for the urine sulfur metabolites monitoring**

It was expectable that the sulfur isotopic enrichments in the urine metabolites after a single dose of enriched yeast were poor. To detect differences between healthy and ill subjects is necessary to employ techniques that achieve a high precision in isotopic ratios measurements. Thus, two double focusing ICP-MS instrument have been compared, one with sequential detection and other with simultaneous detection, in particular as regards the accuracy of measurement of isotope ratios. The results showed a clear advantage of the multicollector instrument measuring sulfur isotopic ratios with the SEM at low concentrations or with the Faraday cups at high concentrations.

On the other hand, an HPLC method has been developed to separate the main sulfur metabolites in urine, comparing different chromatographic types, resulting the reversed phase chromatography which allowed the separation of a greater number of metabolites. Moreover, a new desolvation system was used allowing the introduction of high concentration of organic solvent in the mobile phases.

Finally, in order to quantify the endogenous and exogenous sulfur presented in each chromatographic peak, a continuous post-column flow of  $^{33}\text{S}$  enriched sulfur was added and the IPD mathematic tool was applied.

### **3- Urine sulfur isotopic enrichment evaluation of laboratory animals after the administration of an enriched yeast dose**

Studied were carried out in Wistar rats as in C57 mice after the administration of  $^{34}\text{S}$  enriched yeast dose. The first studies revealed that the isotopic mark could be observed in sulfur compounds excreted in the urine, finding after 12 hours the enrichment maximum.

Later, studies between healthy and prostate cancer mice were carried out to find differences in the sulfur isotopic enrichment between both populations. A first study revealed certain differences between healthy and ill animals with advanced disease stage. Therefore, a second study of the different stages of the disease was performed for 40 weeks. Differences between healthy ill populations were observed, from the early stages, using chemometric techniques for data treatment, both as regards the identification of compounds exhibiting a different behavior in both populations, and to establish global differences between them.



Vicerrectorado de Internacionalización  
y Postgrado  
Universidad de Oviedo



---

**SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA Y ANALITICA /  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISION ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUIMICA FISICA Y  
ANALITICA**



---



---

---

# Índice

---

---

<b>1- Introducción.....</b>	<b>- 17 -</b>
1.1- Importancia biológica del azufre.....	- 19 -
1.2- El azufre y el cáncer.....	- 28 -
1.2.1- Marcadores tumorales .....	- 29 -
1.2.2- Dependencia de metionina .....	- 34 -
1.3- Estudios metabólicos con metionina enriquecida .....	- 38 -
1.3.1- Isótopos de azufre.....	- 38 -
1.3.2- Isótopos estables en estudios metabólicos .....	- 39 -
1.3.3- Síntesis de metionina y cisteína marcada isotópicamente en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 41 -
1.4- Métodos analíticos para la medida de azufre en muestras biológicas.....	- 45 -
1.4.1- Métodos espectrofotométricos .....	- 45 -
1.4.2- Métodos electroquímicos .....	- 50 -
1.4.3- Métodos de espectrometría de masas .....	- 53 -
1.5- El ICP-MS en la determinación de azufre y sus compuestos en material biológico.....	- 55 -
1.5.1- Instrumentos ICP-MS .....	- 55 -
1.5.2- Técnicas híbridas .....	- 65 -
1.6- Análisis por dilución isotópica.....	- 69 -
1.6.1- Principios básicos .....	- 71 -
1.6.2- Ecuación de la dilución isotópica .....	- 72 -
1.6.3- La dilución isotópica para la especiación elemental.....	- 74 -
1.6.4- Deconvolución de perfiles isotópicos.....	- 79 -
<b>2-Objetivos .....</b>	<b>- 83 -</b>

---

<b>3- Experimental .....</b>	<b>- 89 -</b>
3.1- Instrumentación .....	- 91 -
3.1.1- Espectrómetros de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) .....	- 91 -
3.1.2- Instrumentación utilizada para las separaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	- 94 -
3.1.3- Sistema de desolvatación acoplado a los equipos ICP-MS. -	96
3.1.4- Otra instrumentación .....	- 97 -
3.2- Materiales y reactivos .....	- 98 -
<b>4- Síntesis de levadura enriquecida en <sup>34</sup>S.....</b>	<b>- 103 -</b>
4.1- Síntesis de levadura enriquecida en azufre <sup>34</sup> S.....	- 105 -
4.2- Extracción y preconcentración de metionina enriquecida en <sup>34</sup> S. -	125 -
4.2.1- Extracción con HCl 6M.....	- 127 -
4.2.2- Extracción enzimática con proteasa .....	- 128 -
4.2.3- Aislamiento de la metionina <sup>34</sup> S mediante HPLC preparativa- 131 -	
4.3- Caracterización de la Metionina enriquecida en <sup>34</sup> S .....	- 133 -
4.3.1- Caracterización por MC-ICP-MS utilizando <sup>33</sup> S enriquecido ....	- 133 -
4.3.2- Caracterización mediante GC-MS.....	- 134 -
4.4- Cuantificación de metionina en productos dietéticos .....	- 142 -
4.5- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo humano y de ratón .....	- 146 -
4.5.1- Tratamiento de la muestra.....	- 148 -

---

4.5.2- Separación cromatográfica con detección ICP-MS .....	148 -
4.5.3- Identificación mediante GC-MS .....	149 -
4.5.4- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo humano ..	153 -
4.5.5- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo de ratones .....	156 -
4.5.6- Estudios de recuperación .....	157 -
4.6- Conclusiones.....	159 -
<b>5- Desarrollo de una metodología analítica cuantitativa para la monitorización de metabolitos de azufre en orina.....</b>	<b>161 -</b>
5.1- Desarrollo y optimización del sistema cromatográfico HPLC-	163 -
5.1.1- Cromatografía de intercambio catiónico .....	163 -
5.1.2- Cromatografía líquida de fase reversa .....	166 -
5.1.3- Eliminación de los sulfatos de las muestras de orina.....	176 -
5.2- Evaluación y optimización del acoplamiento de un sistema de desolvatación.....	179 -
5.3- Evaluación y comparativa de equipos ICP-MS para la detección de azufre en estudios metabólicos.....	182 -
5.3.1- Configuración del equipo Multicolector ICP-MS.....	183 -
5.3.2- Rango lineal, blancos y límites de detección.....	191 -
5.3.3- Medida de relaciones isotópicas de azufre.....	192 -
5.4- Método de cuantificación de los metabolitos de azufre en la orina.....	200 -
5.5- Conclusiones.....	214 -

---

<b>6- Evaluación del enriquecimiento isotópico de azufre en orina de animales de laboratorio tras suministrarles una dosis de levadura enriquecida .....</b>	<b>- 217 -</b>
6.1- Experimentos con ratas Wistar .....	- 219 -
6.1.2- Primer experimento con ratas.....	- 221 -
6.1.3- Segundo experimento con ratas.....	- 224 -
6.2- Experimentos con ratones C57 sanos y enfermos de cáncer de próstata.....	- 228 -
6.2.1- Normalización de los tiempos de retención.....	- 232 -
6.2.2- Análisis de muestras de orina recogidas .....	- 234 -
6.2.3- Comparativa entre ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata.....	- 238 -
6.3- Estudio de la evolución de la enfermedad en sus diferentes estadios.....	- 243 -
6.3.1- Normalización de los tiempos de retención.....	- 245 -
6.3.2- Evolución del enriquecimiento de los metabolitos con el tiempo.....	- 245 -
6.3.3- Análisis de componentes principales .....	- 252 -
6.3.4- Análisis discriminante .....	- 255 -
6.4- Conclusiones.....	- 257 -
<b>7- Sugerencias para trabajos futuros .....</b>	<b>- 259 -</b>
<b>8- Bibliografía .....</b>	<b>- 263 -</b>

---

## Índice de figuras

- Figura 1. Ruta metabólica de la Metionina*
- Figura 2. Síntesis de aminoácidos de azufre en Saccharomyces cerevisiae*
- Figura 3. Reacción química en la que se basa el método del azul de metileno*
- Figura 4. Reacción de Ellman*
- Figura 5. Esquema de amperometría para la medida de H<sub>2</sub>S*
- Figura 6. Esquema de un cuadrupolo en un equipo ICP-MS*
- Figura 7. Esquema de la medida de azufre 32 en un equipo ICP-MS de triple cuadrupolo*
- Figura 8. Esquema de un equipo ICP-MS de doble enfoque geometría Nier-Johnson inversa (Obtenido de la página web del fabricante)*
- Figura 9. Óptica iónica de doble enfoque con geometría directa*
- Figura 10. Esquema de un equipo ICP-MS multicolector enfoque (Obtenido de la página web del fabricante)*
- Figura 11. Ilustración del fundamento de la dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos (a y b).*
- Figura 12. Equipos ICP-MS utilizados durante esta tesis doctoral*
- Figura 13. Esquema del equipo ICP-MS doble enfoque con detección simple Element II (obtenido de la página web del fabricante)*
- Figura 14. Esquema del equipo ICP-MS de doble enfoque multicolector Neptune Plus (obtenido de la página web del fabricante)*
- Figura 15. Esquema separación HPLC post-columna*
- Figura 16. Esquema del equipo de desolvatación Aridus II (obtenido de la página web del fabricante)*
- Figura 17. Esquema del trabajo con levaduras*
- Figura 18. Medio YPD para la activación de las levaduras*
- Figura 19. Medio YPD distribuido en placas petry*
- Figura 20. Inoculación de levaduras con asa de siembra en medio sólido*

- 
- Figura 21. Levaduras transcurridas 24 horas en la estufa a 28°C*
- Figura 22. Crecimiento levaduras en cámara termostatzada y con agitación*
- Figura 23. Relación entre absorbancia y concentración celular*
- Figura 24. Gráfica teórica del crecimiento de levaduras*
- Figura 25. Gráfica experimental del crecimiento de levaduras*
- Figura 26. Muestra de cultivo bajo el microscopio*
- Figura 27. Recogida de levaduras tras 36 horas de crecimiento*
- Figura 28. Cromatograma de extracción ácida de levadura con detección MC-ICP-MS (415 ppm de azufre en levadura y patrón natural de 5 ppm)*
- Figura 29. Cromatograma de extracción enzimática de levadura optimizada*
- Figura 30. Cromatograma HPLC preparativa de patrón de metionina (detección UV-VIS)*
- Figura 31. Fracción recogida en muestra de levadura digerida (detección UV-VIS)*
- Figura 32. Estructura de metionina derivatizada*
- Figura 33. Cromatograma GC-MS de metionina enriquecida y natural (170 ppm de metionina enriquecida y patrón natural de 5 ppm).*
- Figura 34. Espectro de masas de metionina natural derivatizada*
- Figura 35. Espectro de masas de metionina enriquecida derivatizada*
- Figura 36. Cromatogramas de productos dietéticos con metionina <sup>34</sup>S, A)Solgar, B) Solaray, C) Integralia*
- Figura 37. Cromatograma obtenido para muestra de plasma sanguíneo tras la precipitación de proteínas*
- Figura 38. Cromatograma GC-MS de un patrón natural, un patrón enriquecido y una muestra de plasma sanguíneo*
- Figura 39. Espectro de masas de metionina en plasma sanguíneo derivatizada*
- Figura 40. Cromatograma de plasma añadiendo metionina enriquecida*

- 
- Figura 41. Cromatograma de plasma sanguíneo de ratón*
- Figura 42. Cromatogramas de patrones de azufre por intercambio catiónico (concentración de 5 µg/g para todos los compuestos)*
- Figura 43. Cromatograma de orina de rata en intercambio catiónico y ampliación de la zona hasta 12 minutos*
- Figura 44. Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH en fase reversa con Tris-HCl 30 mM y columna Mediterranea Sea 18 (concentración de 5 µg/g para todos los compuestos)*
- Figura 45. Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, pH 7,4 y columna Mediterranea Sea 18*
- Figura 46. Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, pH 7, 4 con columna Discovery BIO Wide Pore C18*
- Figura 47. Cromatogramas de orina de ratas obtenidas con cromatografía de fase reversa en régimen isocrático y en grandiente*
- Figura 48. Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH utilizando tetrabutilamonio 5 mM (concentración de 5 µg/g para todos los compuestos)*
- Figura 49. Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH utilizando tetrametilamonio 5 Mm (concentración de 5 µg/g para todos los compuestos)*
- Figura 50. Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, tetrabutilamonio 5mM y tetrametilamonio 5mM*
- Figura 51. Cromatograma de orina de rata en fase reversa con acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% de metanol*
- Figura 52. Cromatograma de orina de rata fortificada con metionina y GSH reducido (20 µg/g) en fase reversa con acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% de metanol*
- Figura 53. Cromatograma de orina de rata en fase reversa con acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% de metanol*

---

*Figura 54. Reducción de la señal de los sulfatos tras el tratamiento previo con cloruro de bario 5%*

*Figura 55. Estudio de la variación de la sensibilidad con el aumento el porcentaje de metanol introducido en el Aridus II*

*Figura 56. Cromatograma de muestra de orina de rata con gradiente de metanol utilizando el Aridus II como equipo de desolvatación/nebulización*

*Figura 57. Esquema de la medida de isótopos de azufre en las copas de Faraday*

*Figura 58. Pico de “pseudo-alta” resolución para el  $^{33}\text{S}$*

*Figura 59. Espectro de masas obtenido utilizando las copas de Faraday con una disolución equimolar de  $5\ \mu\text{g/g}$*

*Figura 60. Esquema de la medida de isótopos de azufre en los “Ion Counters”*

*Figura 61. Espectro de masas obtenido utilizando los SEM con una disolución de azufre equimolar de  $100\ \text{ng/g}$  (obsérvese que la señal debido a los interferentes no aparece ya que los SEM se protegen dejando de medir)*

*Figura 62. Precisión obtenida en la medida de la relación isotópica  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  para los equipos ICP-MS evaluados*

*Figura 63. Precisión obtenida en la medida de la relación isotópica  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$  para los equipos ICP-MS evaluados*

*Figura 64. Esquema de la metodología desarrollada para los estudios metabólicos de azufre*

*Figura 65. Factor de magnificación utilizando  $^{33}\text{S}$  como trazador*

*Figura 66. Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba de jeringa (patrón de azufre 33 de  $1\ \mu\text{g/g}$ )*

*Figura 67. Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba de doble pistón (patrón de azufre 33 de  $1\ \mu\text{g/g}$ )*

---

*Figura 68. Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba peristáltica (patrón de azufre 33 de 1  $\mu\text{g/g}$ )*

*Figura 69. Cromatograma de orina de rata con flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  (señal de  $^{\text{nat}}\text{S}$  eje de ordenadas de la izquierda y señal de  $^{33}\text{S}$  eje de ordenadas de la derecha)*

*Figura 70. Cromatograma de relaciones isotópicas (relación  $^{\text{nat}}\text{S}/^{33}\text{S}$  eje de ordenadas de la izquierda y señal de  $^{34}\text{S}/^{33}\text{S}$  eje de ordenadas de la derecha)*

*Figura 71. Cromatograma de fracciones molares (fracción molar  $X_{\text{nat}}$  eje de ordenadas de la izquierda y fracción molar  $X_{34}$  eje de ordenadas de la derecha)*

*Figura 72. Cromatograma de fracciones molares relativas (fracción molar relativa  $X_{\text{nat}}/X_{33}$  eje de ordenadas de la izquierda y fracción molar relativa  $X_{34}/X_{33}$  eje de ordenadas de la derecha)*

*Figura 73. Cromatograma de grado de enriquecimiento en  $^{34}\text{S}$*

*Figura 74. Administración de levadura enriquecida a una rata mediante sonda oral*

*Figura 75. Jaula metabólica especial para ratas*

*Figura 76. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata control*

*Figura 77. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata a las 6 horas*

*Figura 78. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata a las 48 horas*

*Figura 79. Cromatograma de flujo molar relativo para orina control*

*Figura 80. Cromatograma de flujo molar relativo para orina 6 horas*

*Figura 81. Cromatograma de flujo molar relativo para orina 12 horas*

*Figura 82. Cromatograma de flujo molar relativo para orina 24 horas*

*Figura 83. Variación de las áreas de varios picos del cromatograma de flujo molar relativo  $X_{34}/X_{33}$  con el tiempo*

---

*Figura 84. Cromatograma de intensidades de orina de rata y de ratón*

*Figura 85. Jaula metabólica especial para ratones*

*Figura 86. Administración de levadura enriquecida a un ratón mediante sonda oral*

*Figura 87. Cromatograma obtenido para una orina a la que se ha añadido este compuesto como patrón interno*

*Figura 88. Cromatograma de flujo molar relativo para orina control de ratón sano*

*Figura 89. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano obtenida 12 horas después de suministrar levadura enriquecida*

*Figura 90. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano obtenida 24 horas después de suministrar levadura enriquecida*

*Figura 91. Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano y ratón enfermo de cáncer de próstata*

*Figura 92. Azufre enriquecido total excretado para los ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata*

*Figura 93. Grado de enriquecimiento (relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural excretado) para los ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata*

*Figura 94. Enriquecimiento global de ratones sanos y enfermos en cada experimento*

*Figura 95. Dendograma semana 11 del experimento*

*Figura 96. Comparativa de enriquecimiento individual de ratones sanos y enfermos*

*Figura 97. Metabolitos seleccionados para los estudios metabólicos*

*Figura 98. Análisis PCA para ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata*

---

## Índice de tablas

<i>Tabla 1. Compuestos de azufre de importancia biológica.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>Tabla 2. Ejemplos de marcadores tumorales .....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>Tabla 3. Interferencias espectrales para los isótopos de azufre.....</i>	<i>- 59 -</i>
<i>Tabla 4. Composición del medio de cultivo (por litro) .....</i>	<i>- 113 -</i>
<i>Tabla 5. Compuestos del medio de cultivo que contienen azufre en su estructura .....</i>	<i>- 115 -</i>
<i>Tabla 6. Programa de digestión .....</i>	<i>- 122 -</i>
<i>Tabla 7. Condiciones de medida en el equipo DF-ICP-MS.....</i>	<i>- 123 -</i>
<i>Tabla 8. Caracterización de cultivos de levadura enriquecida .....</i>	<i>- 124 -</i>
<i>Tabla 9. Condiciones de medida equipo en el DF-ICP-MS y en el MC-ICP-MS.....</i>	<i>- 126 -</i>
<i>Tabla 10. Condiciones extracción metionina con proteasa XIV para 0,15 g de levadura .....</i>	<i>- 129 -</i>
<i>Tabla 11. Caracterización de metionina enriquecida por ICP-MS ....</i>	<i>- 134 -</i>
<i>Tabla 12. Condiciones de medida equipo en el GC-MS .....</i>	<i>- 136 -</i>
<i>Tabla 13. Caracterización de metionina enriquecida por GC-MS.....</i>	<i>- 142 -</i>
<i>Tabla 14. Cantidad de metionina por pastilla obtenida para los productos dietéticos .....</i>	<i>- 146 -</i>
<i>Tabla 15. Concentración de metionina en plasma sanguíneo humano ....</i>	<i>155 -</i>
<i>Tabla 16. Concentración de metionina en plasma sanguíneo de ratón ....</i>	<i>157 -</i>
<i>Tabla 17. Estudios de recuperación en muestras de plasma sanguíneo ...</i>	<i>158 -</i>
<i>Tabla 18. Gradiente utilizado con Tris-HCl 30 mM, pH 7, 4 con columna Discovery BIO Wide Pore C18 .....</i>	<i>- 170 -</i>
<i>Tabla 19. Gradiente utilizado con columna Discovery BIO Wide Pore C18 y fase móvil de acetato de amonio.....</i>	<i>- 181 -</i>
<i>Tabla 20. LOD para los 2 equipos ICP-MS.....</i>	<i>- 192 -</i>

---

*Tabla 21. Valores obtenidos para la corrección de masas mediante los 3 ajustes teóricos para el DF- ICP-MS ..... - 194 -*

*Tabla 22. Valores obtenidos para la corrección de masas mediante los 3 ajustes teóricos para el MC- ICP-MS ..... - 195 -*

*Tabla 23. Parámetros instrumentales de los equipos ICP-MS para la medida de relaciones isotópicas ..... - 197 -*

*Tabla 24. Parámetros instrumentales y condiciones cromatográficas para los estudios con animales de laboratorio ..... - 207 -*

*Tabla 25. Identificación ratones utilizados ..... - 243 -*

*Tabla 26. Análisis discriminante para 7 ratones desconocidos ..... - 256 -*

---

## Índice de acrónimos

AFP: Alfa-fetoproteína  
CA 125: antígeno carbohidrato 125  
CBS: cistationina-  $\beta$  –sintetasa  
CE: electroforesis capilar  
DC: corriente continua  
DF: doble enfoque  
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico  
FDA: agencia de alimentos y medicamentos  
GC: cromatografía de gases  
GSH: glutatión  
Hcy: homocisteína  
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución  
HUCA: hospital universitario central de Asturias  
IC: “ion counter”  
ICP-MS: espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo  
IDA: análisis por dilución isotópica  
IPD: deconvolución de perfiles isotópicos  
LA: ablación por láser  
LOD: límite de detección  
m/z: relación masa-carga  
MAT: metionina adenosiltransferasa  
MC: multicolector  
Met: metionina  
MS: espectrometría de masas  
MetS.: metionina sintasa  
MTFHBR: N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolato reductasa  
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno

---

SAH: S- adenosilhomocisteína  
SEM: multiplicador de electrones secundarios  
PSA: antígeno prostático específico  
SAM: S-adenosil-l-metionina  
SH: grupos sulfidriilo  
SIM: "single ion monitoring"  
TCA: ácido tricloroacético  
TFA: ácido trifluoroacético  
THF: tetrahidrofolato  
UFC: unidad formadora de colonias  
uPA: Activador del plasminógeno urocinasa (uPA)  
UV-VIS: ultravioleta-visible

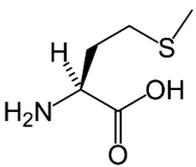
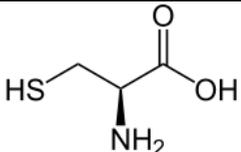
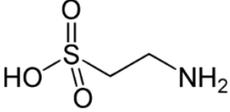
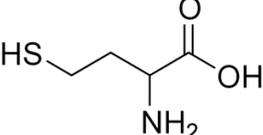
---

# **1- Introducción**

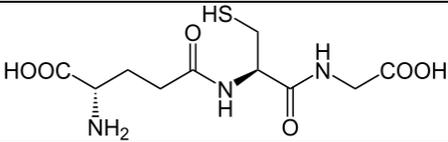
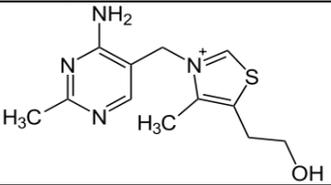
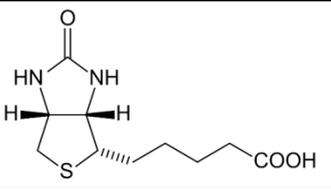
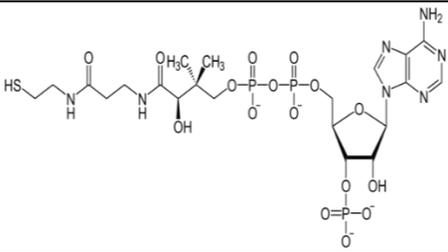
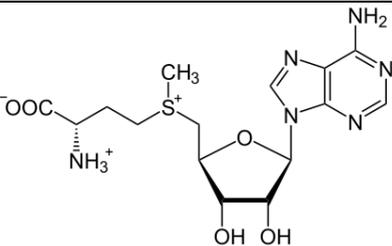
---

## 1.1- Importancia biológica del azufre

El azufre (S) es un componente esencial para todas las células, siendo el tercer mineral más abundante en el cuerpo después del calcio y el fósforo. Se encuentra en la misma proporción que el potasio y es un poco más abundante que el sodio o el cloro. En el cuerpo de un humano de 70 kilogramos se podrían encontrar alrededor de 140 gramos de azufre. Este elemento está presente en multitud de compuestos fundamentales para la vida como aminoácidos, péptidos y proteínas, vitaminas, etc. [1,2]. Las estructuras químicas de algunos de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.

<b>Aminoácidos azufrados</b>	Metionina	
	Cisteína	
	Taurina	
	Homocisteína	

# 1- Introducción

<b>Péptidos</b>	Glutati3n	
<b>Vitaminas</b>	Tiamina (B1)	
	Biotina (B7)	
<b>Enzimas</b>	Coenzima A	
<b>Otros compuestos</b>	SAM (S-adenosil-l-metionina)	

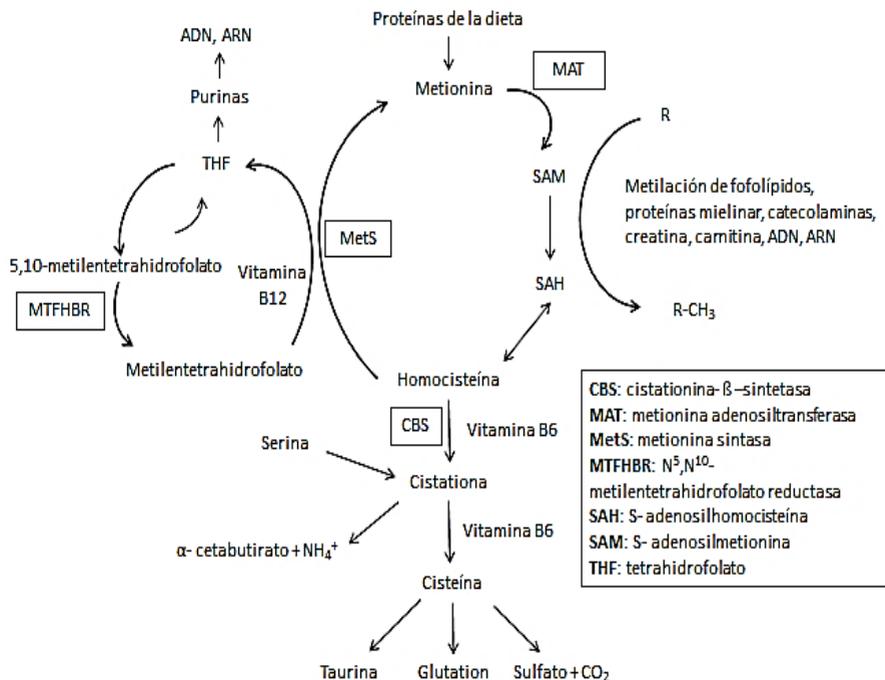
**Tabla 1.** Compuestos de azufre de importancia biol3gica

## **Aminoácidos**

El azufre se encuentran en 4 aminoácidos: metionina, cisteína, taurina y homocisteína. Entre estos aminoácidos destacan la metionina y la cisteína por ser aminoácidos esenciales para el hombre dado que no somos capaces de sintetizarlos por nosotros mismos. Esto implica que la única fuente de estos compuestos para el organismo es la ingesta directa a través de la dieta (p.e. carnes, pescados, lácteos, huevos, frutos secos, etc.). Las rutas metabólicas alternativas a la utilización de estos aminoácidos esenciales suelen ser largas y energéticamente costosas [3].

Por ello, es muy importante tener una dieta equilibrada que pueda aportarnos la cantidad necesaria de aminoácidos esenciales. A partir de ellos se obtienen multitud de compuestos necesarios para el correcto funcionamiento del organismo. Como ejemplo, en la Figura 1 se muestran las principales rutas metabólicas de la metionina en mamíferos.

## 1- Introducción



**Figura 1.** Ruta metabólica de la Metionina

Como se puede observar en la Figura 1, la cisteína se puede producir a través del metabolismo de la metionina (nunca al revés) [4]. Al igual que en el caso de la metionina, el organismo puede obtener la cisteína mediante la degradación de proteínas que contengan este aminoácido. En otros mamíferos distintos a los humanos, los aminoácidos esenciales pueden ser considerablemente distintos. Por ejemplo, a los gatos les falta la enzima que les permitiría sintetizar la taurina, que es un ácido derivado de la cisteína, así que la taurina es esencial para los gatos.

Las principales funciones de los aminoácidos azufrados en el cuerpo humano se exponen a continuación:

### Metionina

La metionina es un antioxidante de gran alcance y una buena fuente de azufre [5]. Ayuda a la descomposición de las grasas evitando la acumulación de grasa en el hígado y las arterias. También ayuda en la eliminación de elementos nocivos como el plomo y otros metales pesados, ayuda a disminuir la debilidad muscular, previene el cabello quebradizo y protege contra los efectos de las radiaciones [6]. Este compuesto es beneficioso para las mujeres que toman anticonceptivos orales ya que promueve la excreción de los estrógenos. Por otro lado, reduce el nivel de histamina en el cuerpo lo que es útil en personas que sufren de esquizofrenia [7].

### Cisteína

La cisteína funciona como un antioxidante de gran alcance en la desintoxicación de toxinas [8,5]. Así, protege al hígado y al cerebro de los daños causados por el alcohol, las drogas y compuestos tóxicos que se encuentran en el humo del cigarrillo. Por otro lado, protege al cuerpo de los daños provocados por la radiación. También se ha utilizado para tratar la artritis reumatoide y el endurecimiento de las arterias [7]. Otras funciones asociadas a este aminoácido son acelerar la recuperación tras quemaduras graves u operaciones quirúrgicas, promover la quema de grasa y la formación de músculos y retrasar el proceso de envejecimiento [9]. Entre un 10% y un 14% de la piel y el cabello se componen de este aminoácido.

### Taurina

La taurina fortalece el músculo cardíaco, mejora la visión, y ayuda a prevenir la degeneración muscular [10]. Es un componente importante de la bilis y es útil para las personas con aterosclerosis, edema, trastornos del corazón, hipertensión o hipoglucemia. Es un aminoácido vital para la correcta utilización del sodio, potasio, calcio y magnesio, y ayuda a prevenir el desarrollo de arritmias cardíacas potencialmente peligrosas. La taurina se ha utilizado para tratar la ansiedad, epilepsia, hiperactividad, mal funcionamiento cerebral y convulsiones [7].

### Homocisteína

La homocisteína es un aminoácido azufrado que participa en la transferencia de grupos metilos durante el metabolismo celular [11]. Recientes estudios han observado la relación entre la hiperhomocisteinemia (aumento de la concentración plasmática de homocisteína) y daños en las células neuronales. También se ha relacionado con el aumento en mecanismos neurotóxicos como: aumento del estrés oxidativo y generación de derivados de homocisteína así como con el incremento en la toxicidad de la proteína  $\beta$ -amiloide, entre otros [7].

### Péptidos y proteínas

El azufre se encuentra presente en los aminoácidos proteínogénicos cisteína y metionina, es decir, en dos aminoácidos del exclusivo grupo de veinte que pueden participar en la formación de proteínas. A pesar

de que ninguno de los dos se encuentra en gran abundancia en las proteínas, si aparecen en la gran mayoría de ellas. Juntos exhiben una abundancia próxima al 3-4% en proteínas eucarióticas, lo que significa que estadísticamente todos los péptidos/proteínas con una longitud de al menos 30 residuos de aminoácidos contienen azufre. Esto supone que aproximadamente el 93% de las proteínas conocidas contienen azufre en su secuencia [12].

El Glutatión (GSH) es un péptido que contiene cisteína en su estructura. Es un tripéptido muy abundante a nivel intracelular con numerosas funciones biológicas, entre las que destacan su papel antioxidante ayudando a proteger las células de los radicales libres y los peróxidos [13], desempeñar una tarea clave en la detoxificación de xenobióticos [14] y actuar como almacén de azufre [15]. De hecho, cualquier exceso en la dieta de cisteína y metionina no se almacena como tales especies en el organismo, sino que se excreta en forma de sulfato a través de la orina o se almacena en forma de GSH [16]. El GSH es el tiol más abundante en las células, llegando a concentraciones superiores a 12mM.

Los proteínas de azufre-hierro, que contienen los grupos  $Fe_2S_2$ , están presentes en todos los organismos vivos, siendo una familia de más de 120 proteínas y enzimas [17]. Los átomos de azufre de estos grupos son liberados mediante tratamiento ácido, por lo que son denominados azufre ácido-inestable (*sulfur acid-labile*). La función principal de estos grupos es la de transferir un electrón en reacciones redox y, por tanto, están presentes en las cadenas de transferencia electrónica de la respiración y la fotosíntesis [17]. Además, actúan como centros catalíticos y sensores del hierro y del oxígeno en diversas reacciones [18].

## 1- Introducción

---

El azufre también es necesario para la formación del colágeno y otros componentes proteicos que forman parte del tejido conectivo, como la queratina que forma parte de la piel, y otros mucopolisacáridos que componen los huesos, los cartílagos, los tendones y los ligamentos.

### **Vitaminas**

El azufre está presente en la vitamina B1 (tiamina). Esta vitamina juega un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, principalmente para producir energía. Además participa en el metabolismo de grasas, proteínas y ácidos nucleicos (ADN, ARN). Es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de la mayor parte de los vertebrados y ayuda a mantener el funcionamiento propio del corazón, sistema nervioso y digestivo.

Asimismo, el azufre forma parte de la vitamina B7 (biotina), esencial para la síntesis y degradación de grasas y la degradación de ciertos aminoácidos. Este compuesto actúa además como cofactor de las enzimas que intervienen en la catálisis de reacciones metabólicas esenciales para sintetizar ácidos grasos, en la gluconeogénesis y en el metabolismo de la leucina.

### **Enzimas**

Se sabe que aproximadamente un 40% de las enzimas (entre ellas ferredoxinas, nitrogenasas, etc.) dependen para su actividad catalítica de la presencia de tioles (SH). Dichos grupos SH proporcionan sitios de unión para la destoxicación de drogas diversas y se ven involucrados

en numerosas reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación.

La coenzima A contiene también azufre. Esta coenzima desempeña un papel clave en la biosíntesis y la oxidación de ácidos grasos, así como en la oxidación del piruvato en el ciclo del ácido cítrico. También participa en el transporte de los ácidos grasos desde el citoplasma a la mitocondria. Cuando contiene un grupo acetilo, se le conoce como acetil-coenzima A, molécula presente en numerosas reacciones bioquímicas de los procesos metabólicos.

### **Otros compuestos de interés**

El azufre también tiene un papel importante en el correcto funcionamiento de la insulina. La molécula de insulina consta de dos cadenas de aminoácidos conectadas entre sí por puentes de azufre, sin los cuales la insulina no podría desempeñar su actividad biológica.

El compuesto azufrado conocido como SAM (S-adenosil-l-metionina) es el principal agente metilante en todos los organismos. El grupo metilo unido al átomo de azufre de la metionina en la SAM es químicamente reactivo. Esto permite la donación de este grupo a un aceptor en las reacciones de transmetilación [19]. Más de 40 reacciones metabólicas involucran la transferencia de un grupo metilo desde la SAM a varios sustratos tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Así mismo, las reacciones de transmetilación mediadas por SAM son clave en la regulación de la expresión genética y de la actividad de diversas enzimas así como en la producción de antibióticos. Además, diversas investigaciones y estudios clínicos indican que la ingesta de SAM de

forma regular puede ayudar a combatir la depresión [20] las enfermedades de hígado [21] y el dolor de la artrosis [22].

### **1.2- El azufre y el cáncer**

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones [23]. Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol.

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión desde una lesión precancerosa hasta un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos:

- carcinógenos físicos (por ejemplo las radiaciones ultravioleta e ionizantes).
- carcinógenos químicos (por ejemplo los componentes del humo de tabaco).
- carcinógenos biológicos (las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos).

La mortalidad por cáncer se puede reducir si los casos se detectan y tratan a tiempo. Las actividades de detección temprana tienen dos componentes:

- El diagnóstico temprano: Consiste en conocer los signos y síntomas iniciales para facilitar el diagnóstico y el tratamiento antes de que la enfermedad alcance una fase avanzada.
- Programas de detección: Es la aplicación sistemática de una prueba de detección en una población asintomática con el fin de descubrir a los pacientes que presentan anomalías indicativas de un cáncer determinado o de una lesión precancerosa y así poder diagnosticarlos y tratarlos prontamente.

### **1.2.1- Marcadores tumorales**

Los marcadores tumorales son sustancias producidas por las células cancerosas o por otras células del cuerpo como respuesta al cáncer o a ciertas afecciones benignas (no cancerosas). La mayoría de los marcadores tumorales son producidos tanto por las células normales como por las células cancerosas, pero aparecen en concentraciones anormalmente más altas en pacientes con cáncer. Estas sustancias

## 1- Introducción

---

pueden encontrarse en la sangre, en la orina, en la materia fecal, en tejido tumoral o en otros tejidos o líquidos del cuerpo. La mayoría de los marcadores tumorales son proteínas. Sin embargo, los patrones de expresión de los genes y los cambios de ADN en el tejido tumoral han empezado a usarse recientemente como marcadores tumorales.

Hasta ahora, se han caracterizado y se usan en la clínica médica más de 20 marcadores tumorales. Algunos están asociados con un solo tipo de cáncer, mientras que otros están asociados con dos o más tipos de cánceres. No existe un marcador tumoral "universal" que permita detectar cualquier tipo de cáncer.

Hay algunas limitaciones en el uso de marcadores tumorales. En ocasiones, las concentraciones de algunos de estos marcadores pueden estar alteradas por otras causas distintas a la de la enfermedad. Desgraciadamente, no todos los individuos que padecen un tipo particular de cáncer tienen concentraciones elevadas del marcador asociado con este tipo de cáncer. Además, no existen marcadores tumorales específicos para todos los tipos de cánceres.

Aunque los marcadores tumorales ayudan a detectar, diagnosticar y controlar algunos tipos de cáncer, la detección de una concentración elevada de un marcador no es suficiente para diagnosticar un tumor. Por lo tanto, las mediciones de los marcadores tumorales se combinan en general con otras pruebas, como las biopsias.

La evaluación de las concentraciones de los marcadores tumorales antes de aplicar un determinado tratamiento permite planificar, en ocasiones, la terapia más adecuada. En algunos tipos de cáncer, la concentración de un marcador refleja el estadio (extensión) de la enfermedad y el pronóstico del paciente (resultado probable o curso de

una enfermedad). Los marcadores tumorales pueden también medirse periódicamente durante el tratamiento del paciente. Un descenso de la concentración de un marcador y el regreso a la concentración normal puede indicar que el cáncer está reaccionando al tratamiento, mientras que si no hay cambio o hay un aumento puede indicar todo lo contrario. Estos marcadores también pueden medirse después de que haya terminado el tratamiento para revisar la posible recurrencia de la enfermedad.

En la tabla 2 se numeran algunos de los marcadores de cáncer que se utilizan en la actualidad.

<b>Activador del plasminógeno urocinasa (uPA) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de seno
<b>Tejido analizado</b>	Tumor
<b>Como se usa</b>	Para determinar la malignidad del cáncer y guiar el tratamiento
<b>Alfa-fetoproteína (AFP)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de hígado y cáncer de testículo
<b>Tejido analizado</b>	Sangre
<b>Como se usa</b>	Para ayudar a diagnosticar cáncer de hígado y vigilar la reacción al tratamiento; para evaluar el estadio, el pronóstico y la reacción al tratamiento de tumores de células germinativas
<b>Análisis de mutación del EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de pulmón
<b>Tejido analizado</b>	Tumor
<b>Como se usa</b>	Para ayudar a determinar el tratamiento y el pronóstico

## 1- Introducción

<b>Antígeno prostático específico (PSA)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de próstata
<b>Tejido analizado</b>	Sangre
<b>Como se usa</b>	Para evaluar si el tratamiento está funcionando o si la enfermedad ha regresado
<b>CA-125 (antígeno carbohidrato 125)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de ovarios
<b>Tejido analizado</b>	Sangre
<b>Como se usa</b>	Para ayudar en el diagnóstico, en la evaluación de la reacción al tratamiento y en la evaluación de la recurrencia
<b>Fibrina y fibrinógeno</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de vejiga
<b>Tejido analizado</b>	Orina
<b>Como se usa</b>	Para vigilar el avance y la reacción al tratamiento
<b>Receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR)</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de seno
<b>Tejido analizado</b>	Tumor
<b>Como se usa</b>	Para determinar si el tratamiento con terapia hormonal es adecuado
<b>Tiroglobulina</b>	
<b>Tipo de cáncer</b>	Cáncer de tiroides
<b>Tejido analizado</b>	Sangre
<b>Como se usa</b>	Para evaluar la reacción al tratamiento y buscar la recurrencia

*Tabla 2. Ejemplos de marcadores tumorales*

Para que un examen de detección precoz sea útil, es necesario una alta sensibilidad (capacidad para identificar correctamente a los individuos que tienen la enfermedad) y especificidad (capacidad para identificar

correctamente a los individuos que no tienen la enfermedad). Aunque los marcadores tumorales son muy útiles para determinar si un tumor está reaccionando al tratamiento o para evaluar si el cáncer ha regresado, ningún marcador tumoral de los conocidos hasta el momento es suficientemente sensible y/o específico para usarse por sí mismo como examen de detección de cáncer.

Así, la medición de la concentración de PSA en sangre se usa con frecuencia para la detección del cáncer de próstata. Sin embargo, una concentración anormalmente alta de PSA puede ser causada también por afecciones benignas de próstata. De hecho, la mayoría de los hombres que tienen una concentración elevada de PSA en sangre no tienen cáncer de próstata. Dos recientes estudios [24,25] han observado que las pruebas de PSA suponen sólo una reducción pequeña del número de muertes por cáncer de próstata. Por otro lado, en otro estudio similar [26] se observó que el CA-125, un marcador tumoral que a veces se encuentra elevado en la sangre de mujeres con cáncer de ovarios, puede también estar elevado en mujeres con enfermedades benignas.

La búsqueda de marcadores tumorales sensibles y específicos representa un gran reto para los científicos y es uno de los campos donde mayores esfuerzos se están haciendo realizando actualmente [27,28,29].

### **1.2.2- Dependencia de metionina**

Como ya se ha comentado previamente, la metionina es un aminoácido esencial con al menos 4 funciones principales:

1. Participa en la síntesis de proteínas.
2. Es precursor del glutatión, un tripeptido que protege a las células del estrés oxidativo [30].
3. Actúa sobre las grasas en el cuerpo impidiendo su acumulación, en especial en el hígado.
4. Es la principal fuente de grupos metilo en la metilación del ADN y otras moléculas.

Desde comienzos de los años 70, diversos estudios han descubierto que numerosas células tumorales humanas se caracterizan, entre otros aspectos, por su imposibilidad de reproducirse cuando la metionina es reemplazada por su inmediato precursor, la homocisteína, mientras que las células sanas pueden proliferar sin ningún problema [31,32,33,34]. La necesidad de metionina para el crecimiento celular es conocida como “dependencia de metionina”.

Las células sanas pueden crecer en un medio que contenga en vez de metionina su inmediato precursor metabólico homocisteína. Las células que proliferan en dicho medio son denominadas células independientes de metionina. Todas las líneas celulares normales provenientes de humanos que han sido probadas en cultivos, incluyendo los fibroblastos y células de hígado, riñón y epitelio, son independientes de metionina [31,33,35,36,37]. Sin embargo, muchas líneas celulares malignas (tales como mama, pulmón, colon, riñón, vejiga, glioblastoma, etc) son dependientes de metionina [38,39].

De esta manera, la dependencia de metionina es un fenotipo de las células tumorales que nunca ha sido observado en células normales. A pesar de todos los estudios llevados a cabo, todavía se desconocen las causas concretas de esta dependencia por parte de las células tumorales.

A día de hoy, las hipótesis que tienen mayor respaldo y que podrían explicar esta dependencia son:

1. Incremento de la necesidad de metionina por parte de las células tumorales. Este incremento puede ser debido al aumento en la síntesis de proteínas por parte de las células neoplásicas o el aumento de la metilación del ADN [40,41]. Por lo tanto, en un medio sin metionina, las células tumorales no podrán seguir sintetizando proteínas lo que conlleva la muerte celular en un plazo menor de 24 horas [42].
2. Deficiencia funcional de la metionina-sintasa. La alteración de la actividad de la enzima puede provocar su inactivación o un descenso en el soporte del cofactor necesario para su función. Se han descrito casos de líneas celulares de glioma y melanoma con una baja actividad de la enzima metionina-sintasa [43]. Si esta enzima tiene bajos niveles de actividad, significaría que parte de los procesos descritos en la Figura 1 no tendrían lugar.

### **Aplicabilidad de la dependencia de metionina**

Estudios in vivo han demostrado la aplicabilidad de la restricción de metionina en células tumorales como un interesante enfoque terapéutico para varios tipos de cáncer [44]. Para reducir la cantidad de

## 1- Introducción

---

metionina en los tumores se han utilizado diversos tratamientos dietéticos y farmacológicos.

### Privación nutricional

Los primeros estudios in vivo se centraron en la principal fuente de metionina: la alimentación. Para ello, se ensayaron diferentes dietas en animales. Sin embargo, la limitación de la metionina exógena a través de dietas con baja cantidad de proteínas no permitía mantener un buen nivel nutricional. En dichos experimentos, los animales perdían rápidamente masa corporal y morían debido a profundas alteraciones en su estado de salud [45]. Para mantener un adecuado nivel nutricional, diversos equipos de investigación utilizaron dietas sintéticas que aportaban un alto contenido calórico con un preciso control de los compuestos ingeridos [46,47].

Aunque una dieta exenta de metionina y homocisteína de larga duración no es tolerable por los organismos, algunos estudios [46] indicaban que la actividad antitumoral era mejor en estas circunstancias que en una dieta en la que se suministraba homocisteína en lugar de metionina. Otros grupos [48] realizaron experimentos en los que se suministraba una dieta exenta de metionina y homocisteína durante cortos periodos de tiempo. Se observó una regresión del tumor y una extensión de la vida de los animales, sin reducir el peso corporal ni poner en peligro su salud.

### Privación enzimática

Los organismos tienen dos fuentes de metionina: exógena (alimentación) y endógena vía la degradación de proteínas o la regeneración de la misma a partir de la homocisteína. Esta regeneración (ver Figura 1) está catalizada por la enzima metionina sintasa (MetS). La dificultad de reducir la metionina *in vivo* mediante la privación nutricional recae en las numerosas fuentes de metionina existentes en la alimentación.

Se pueden conseguir mayores reducciones de la metionina con el uso de la enzima l-metionine adenosine-methyltransferase, también conocida como metioninasa, la cual degrada rápidamente la metionina en el organismo. En los estudios llevados a cabo, se consiguió reducir la cantidad de metionina en plasma utilizando dicha enzima sin observarse efectos adversos en los animales utilizados [49,50,51,52].

### Privación de metionina junto con otros métodos terapéuticos

Como ya se ha comentado, una prolongada restricción de metionina ocasiona la regresión del tumor, pero la interrupción del tratamiento da como resultado la regeneración del mismo [53]. Además, una prolongada restricción de la metionina a través de la dieta no es adecuada para el uso clínico. Por lo tanto, la restricción de la metionina debe formar parte de una terapia combinada. De hecho, la restricción de metionina actúa sinérgicamente con otros tratamientos del cáncer para aumentar su eficacia y/o reducir sus posibles efectos secundarios.

Una posible terapia combinada sería la privación de metionina junto con el tratamiento de quimioterapia. Estudios que combinaban la

privación de metionina junto con el agente de quimioterapia 5-fluoroacil mostraban una mejor actividad antitumoral y mejor respuesta histológica [54,55,56,57]. Otros estudios combinaban la mencionada privación de la metionina con agentes quelantes, mejorando así su índice terapéutico [58].

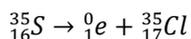
### **1.3- Estudios metabólicos con metionina enriquecida**

Para llevar a cabo estudios metabólicos del azufre se necesita encontrar una marca química que delate la presencia del elemento marcado en los compuestos químicos que participan en los procesos bioquímicos. Uno de los modos de introducir dicha marca es mediante el uso de isótopos enriquecidos de azufre. Para ello, una opción es sintetizar metionina enriquecida en uno de los isótopos minoritarios del azufre ( $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  ó  $^{36}\text{S}$ ) con objeto de detectar posteriormente la marca isotópica mediante espectrometría de masas.

#### **1.3.1- Isótopos de azufre**

De los 25 isótopos de azufre conocidos, la mayoría son isótopos radioactivos obtenidos artificialmente con vidas medias del orden de segundos o incluso milisegundos, lo que limita enormemente su aplicabilidad analítica. Sólo el isótopo radiactivo natural de azufre-35 ( $^{35}\text{S}$ ), formado al incidir la radiación cósmica sobre el argón-40

atmosférico, posee una vida media de 87 días experimentando un decaimiento beta según la reacción:



El  ${}^{35}\text{S}$  se ha utilizado en el pasado como trazador en la mayoría de estudios fundamentales del metabolismo básico de azufre y sus aminoácidos [59,60], en estudios de síntesis y degradación de proteínas (recambio proteico) [61,62] y en estudios farmacocinéticos y del metabolismo de drogas y medicamentos que contienen azufre en su estructura [63,64,65].

Solo cuatro de los isótopos naturales de azufre son estables ( ${}^{32}\text{S}$ ,  ${}^{33}\text{S}$ ,  ${}^{34}\text{S}$  y  ${}^{36}\text{S}$ ). El isótopo mayoritario es el azufre-32 con una abundancia del 94,93%. Es de destacar la baja abundancia isotópica que presentan los isótopos  ${}^{33}\text{S}$  (0,76%),  ${}^{34}\text{S}$  (4,29%) y  ${}^{36}\text{S}$  (0,02%), lo que los hace muy adecuados para su uso como trazadores en estudios metabólicos.

### **1.3.2- Isótopos estables en estudios metabólicos**

Los primeros trabajos con trazadores isotópicos se realizaron empleando radioisótopos, primero en animales y después en humanos. Los isótopos radioactivos comenzaron a ser muy populares para el estudio de la absorción y metabolismo de minerales en los años 40 del siglo pasado, pero esta popularidad ha decrecido en los últimos años debido a los riesgos de la radioactividad [66].

Desde una perspectiva de investigación y desarrollo, los radioisótopos presentan varias ventajas como trazadores. En primer lugar, la cantidad de radioisótopo necesaria para poder monitorizarlo suele ser muy

## 1- Introducción

---

pequeña, con lo que la perturbación que el trazador produce en el sistema investigado es también pequeña. Además, la cantidad de trazador absorbido y remanente en el organismo se puede determinar de modo inequívoco. Generalmente son métodos baratos y el sistema de detección empleado simple. La principal desventaja de los radioisótopos es el problema de seguridad que plantean debido a la exposición del individuo a la radiación. Además, no se pueden utilizar en estudios en recién nacidos ni en mujeres embarazadas o lactantes. El análisis con radioisótopos es dependiente de la vida media del mismo (tiempo de decaimiento). Por otra parte, sólo se puede suministrar un elemento radiactivo por análisis y se genera un costoso problema con los residuos [67].

R. Schoenheimer y D. Rittenberg introdujeron en 1935 el uso de isótopos estables enriquecidos en estudios metabólicos [68]. El enfoque general para estudios metabólicos utilizando isótopos estables es el mismo que con el empleo de isótopos radiactivos. Sin embargo, el empleo de isótopos estables enriquecidos, dado que no existe radiación emitida, presenta ciertas ventajas, entre las que destacan: efectos mínimos sobre la salud de los individuos, pudiéndose aplicar por tanto a mujeres embarazadas y a recién nacidos; las muestras se pueden conservar sin la pérdida del trazador; se puede seguir la marca durante largos periodos; posibilidad de re-análisis; etc. Además, los métodos de análisis empleados se basan en la determinación por espectrometría de masas, en especial con plasma de acoplamiento inductivo ICP-MS [69,70,71], lo que abre la puerta a procedimientos multielementales y multiisotópicos [72,73,74,75,76].

Como ya se ha comentado, en el pasado, los estudios de metabolismo utilizando trazadores de azufre se han llevado a cabo usando  $^{35}\text{S}$

radiactivo [77,78], siendo pocas los estudios publicados que utilizan isótopos estables de azufre [79,80,81]. Sin embargo, se ha publicado recientemente que el marcaje metabólico con azufre-35 radiactivo puede inhibir el ciclo de progresión, proliferación y supervivencia celular [82], lo que justificaría aún más el uso de isótopos estables de azufre para realizar este tipo de estudios.

### **1.3.3- Síntesis de metionina y cisteína marcada isotópicamente en *Saccharomyces cerevisiae***

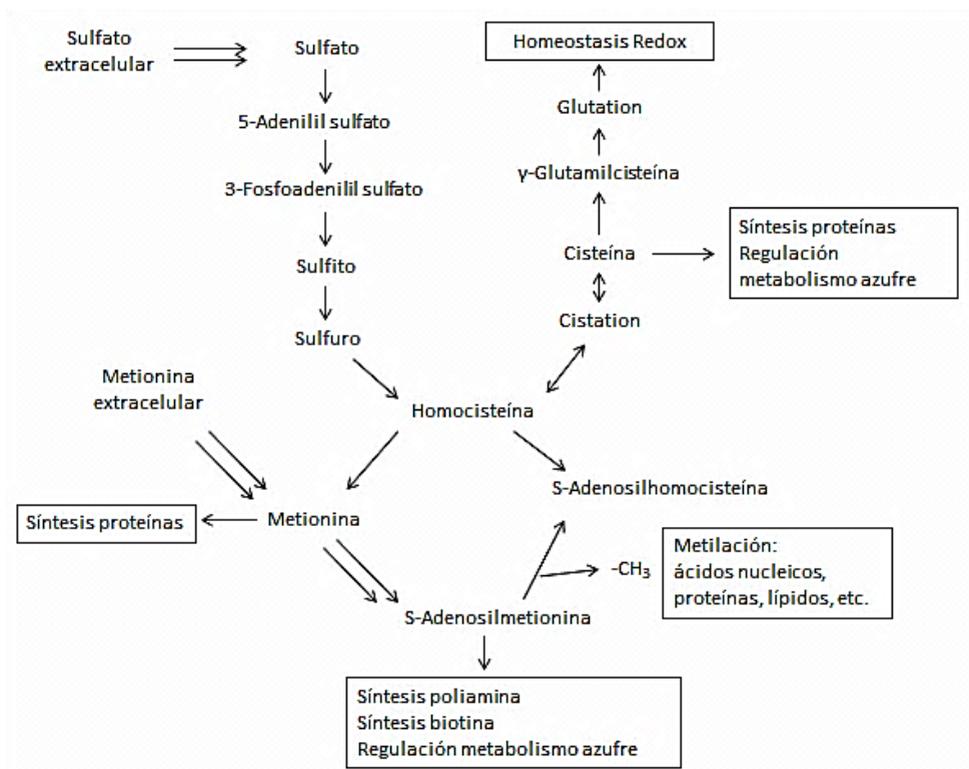
Los estudios de metabolismo de proteínas en mamíferos utilizando isótopos estables enriquecidos de azufre, pueden llevarse a cabo mediante la síntesis previa de los aminoácidos proteinogénicos cisteína y/o metionina marcados con un isótopo enriquecido de azufre. Los mamíferos no son capaces de sintetizar estos aminoácidos esenciales y necesitan obtenerlos a través de la alimentación [83]. Es decir, no se pueden utilizar como trazadores metabólicos en mamíferos especies químicas de azufre diferentes a la metionina, la cisteína o un péptido/proteína que las contengan, ya que el trazador no se incorporaría a las proteínas del organismo. Por el contrario, otros seres vivos pueden reducir el sulfato inorgánico a sulfuro y sintetizar a partir de él compuestos orgánicos de azufre [84].

Algunos microorganismos procariota (p.e. *Escherichia coli*) así como microorganismos eucariota (p.e. levaduras) [85] son una elección ventajosa para este tipo de estudios debido a las elevadas tasas de crecimiento celular que pueden alcanzar [86]. En este sentido, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es considerada una sustancia ideal para su uso en experimentos con trazadores metabólicos en animales o

## 1- Introducción

humanos. Este hecho se debe a su clasificación como organismo reconocido como seguro para la salud (GRAS) por la agencia de alimentos y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, debido a su inocuidad y a la posibilidad de administrarla como alimento por vía oral.

La Figura 2 recoge las rutas de biosíntesis de los aminoácidos azufrados a partir de sulfato en la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*.



**Figura 2.** Síntesis de aminoácidos de azufre en *Saccharomyces cerevisiae*

Los cultivos de levaduras han sido ampliamente utilizados para la síntesis de compuestos marcados. Esto se debe a que las levaduras utilizan azúcares solubles y ácidos orgánicos para producir biomasa con alto contenido en proteínas y además, su producción es fácil de controlar. Para ello, los medios de cultivo deben estar enriquecidos en el isótopo que se utilizará como marca isotópica en futuras aplicaciones. La familia de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la más utilizada debido a su inocuidad en el organismo. Esta levadura se ha aplicado principalmente para la obtención de suplementos alimenticios de selenio.

Las selenolevaduras son el producto de la fermentación anaeróbica de *S. Cerevisiae* en un medio enriquecido en selenio. El medio suele ser melaza de remolacha o de caña (algunos investigadores utilizan glucosa pura) en el cual se han añadido vitaminas, sales nutricionales y otros factores de crecimiento para asegurar la máxima producción de biomasa. Como fuente de selenio se añaden sales de selenio, como el selenito de sodio. El crecimiento de las levaduras se controla mediante el método de Plackett–Burman que incluye fijar una serie de condiciones experimentales, tales como el pH, la temperatura, la velocidad de crecimiento de las levaduras o la cantidad de aire presente [87]. El final del proceso consiste en pasteurizar y secar la pasta de levadura para matar las células. Como resultado de la fermentación en el medio enriquecido en selenio, este elemento se enlaza a la levadura, en una cantidad entre el 60%-80%. En nuestro grupo de investigación, se sintetizó levadura enriquecida en selenio 77 para la obtención de selenometionina marcada en dicho isótopo [88]. Para ello se utilizó un medio de cultivo sintético adicionando los reactivos necesarios para el correcto crecimiento de la levadura.

## 1- Introducción

---

Muchos estudios se han centrado en la biodisponibilidad de las especies de selenio procedentes de estos cultivos de levaduras [89, 90, 91]. En todos los casos se ha encontrado que la principal especie presente es la selenometionina, con una proporción entre 54-74 % del selenio total, acompañada de otros compuestos orgánicos de selenio [92]. Además la seleno-levadura se ha utilizado en multitud de investigaciones relacionadas con la salud como estudios de prevención del cáncer [93], influencia en biomarcadores del estrés oxidativo [94] o progresión del VIH [95] entre otros.

No es habitual el uso de levaduras para la obtención de compuestos enriquecidos de azufre. Esta línea de investigación se inició en nuestro grupo de investigación llevando a cabo la síntesis de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo enriquecido en azufre <sup>34</sup> [96]. Se utilizó un medio de cultivo sintético exento de azufre natural, al cual se añadieron todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura (aminoácidos, vitaminas, fuente de carbono,...). Al final la levadura se caracterizó observándose un enriquecimiento de un 70% en <sup>34</sup>S en los cultivos celulares. Posteriormente, esta levadura enriquecida en <sup>34</sup>S se utilizó en unos primeros estudios con animales de laboratorio [81]

## **1.4- Métodos analíticos para la medida de azufre en muestras biológicas**

En esta sección se describirán brevemente los métodos analíticos más utilizados para la determinación de azufre y sus compuestos en muestras biológicas. Previamente a la determinación de los compuestos de azufre se requiere, en la mayoría de los casos, el uso de un pretratamiento de la muestra y/o una técnica de separación (HPLC, GC, EC).

Los compuestos de azufre en muestras biológicas pueden presentarse como metionina, cisteína, taurina, sulfato inorgánico, etc. También puede encontrarse como azufre inorgánico en las siguientes formas  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  o  $\text{S}^{2-}$  en fase acuosa o como  $\text{H}_2\text{S}$  en fase gas.

Por tanto, el azufre se encuentra en múltiples estados de oxidación en los sistemas biológicos. La forma más activa en las biomoléculas es como grupo tiol (-SH), presente en numerosos compuestos biológicos como la cisteína, la homocisteína o el glutatión.

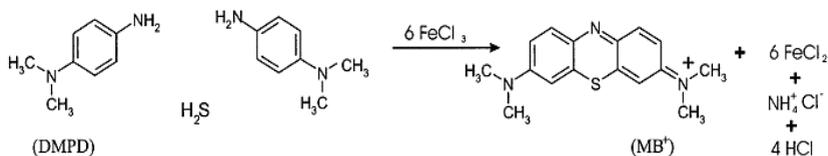
### **1.4.1- Métodos espectrofotométricos**

#### **1.4.1.1- Reacciones colorimétricas y detección UV-VIS**

El método más utilizado para la determinación del sulfuro es el método del azul de metileno según la reacción:

## 1- Introducción

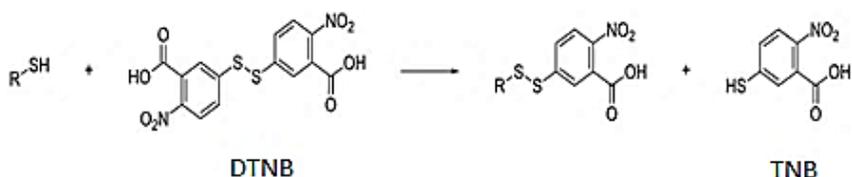
---



**Figura 3.** Reacción química en la que se basa el método del azul de metileno

El azul de metileno formado se monitoriza midiendo a 670 nm. Este método es aún hoy en día muy utilizado debido a su simplicidad, selectividad y sensibilidad. Algunos ejemplos son la monitorización del adrenodoxin, un compuesto de hierro-azufre presente en el tejido suprarrenal [97], las proteínas hierro-azufre del complejo mitocondrial III presente en la cadena respiratoria de las mitocondrias de corazón de vaca [98] o el sulfuro procedente de reacciones enzimática producidas en el hígado y riñón de rata [99]. También ha sido utilizado en estudios sobre la posible relación entre el H<sub>2</sub>S y la isquemia de miocardio en ratas midiendo la concentración de dicho compuesto en el plasma [100].

El reactivo de Ellman o DTNB [101] ha sido utilizado para la determinación de grupos tiol en diversas muestras según la reacción:



**Figura 4.** *Reacción de Ellman*

El DTNB reacciona con el grupo tiol de las cisteínas de los péptidos, para formar disulfuros y TNB, cuyo color amarillo puede ser medido a 412 nm.

Esta metodología se ha aplicado al estudio de la oxidación de proteínas que contenían el grupo SH mediante el oxígeno y su prevención por GSH en muestras de hígado de rata [102]. También se ha utilizado en el estudio de la concentración de tioles libres en plasma en pacientes con hipertensión asociada a la obesidad [103], el estado de oxidación del glutatión de las células rojas sanguíneas [104], el glutatión en sangre como medida del estrés oxidativo en niños con síndrome de dificultad respiratoria [105] o la determinación del glutatión oxidado en sangre y diversos tejidos [106].

La cromatografía de pares iónicos con detección UV-VIS se ha utilizado para la determinación de tiopronina y d-penicilamina, dos drogas utilizadas en diversas enfermedades, tras la derivatización con el compuesto 2-cloro-1-metilquinolinium tetrafluoroborato [107]. También se ha utilizado esta metodología para la determinación de diferentes especies de homocisteína en plasma humano [108].

### 1.4.1.2- Métodos de luminiscencia molecular

El  $\text{SO}_2$  se puede monitorizar mediante medidas de fluorescencia molecular ya que la molécula emite radiación fluorescente cuando es irradiada con luz ultravioleta entre 190-230 nm.

Este método puede aplicarse a la medida de sulfitos y bisulfitos que son generados a partir de aminoácidos de azufre como la cisteína o el glutati6n en células vivas [109].

La medida de sulfuro también puede llevarse a cabo utilizando un método de fluorescencia molecular. Para ello, una posibilidad es la reducción del grupo azida de un fluoróforo por el  $\text{H}_2\text{S}$  para dar un compuesto fluorescente. Este método se ha aplicado en el estudio de la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  endógeno en células vivas y su contribución a los procesos fisiológicos y patológicos del organismo [110,111,112,113].

Otra posibilidad es la reducción de un grupo nitro de un fluoróforo por el  $\text{H}_2\text{S}$  para formar un compuesto fluorescente [114,115]. Estas técnicas han sido utilizadas para el "bioimaging" del  $\text{H}_2\text{S}$  en células vivas de cultivos celulares a los que se había añadido una cantidad de  $\text{H}_2\text{S}$ , de tal manera que las células tuvieran este compuesto en altas concentraciones. Sin embargo, no hay métodos para la medida intracelular de  $\text{H}_2\text{S}$  en cultivos sin adulterar. La fluorescencia del  $\text{H}_2\text{S}$  también ha sido utilizada para el seguimiento de reacciones intracelulares [116], estudios que relacionan la inflamación y la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  in vivo e in vitro [117,118] y el equilibrio  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  intracelular [119].

Por otro lado, también se han desarrollado métodos para la determinación de la molécula glutati6n mediante fluorescencia. Estos

métodos se basan en la utilización de un reactivo no-fluorescente que reacciona con el GSH de manera rápida y específica formando un compuesto estable fluorescente. Así, se ha podido medir cisteína y GSH en el suero de la sangre humana con el ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico (HQS) [120]. Otro reactivo utilizado en este tipo de ensayos, es el 5-maleimidil-2-(m-metilfenil)benzoxazol (MMBP), el cual reacciona selectivamente con el GSH frente a otras moléculas que puedan contener tioles como la cisteína, lo que evita el pre-tratamiento de la muestra. Esta metodología también se ha aplicado a la determinación de GSH en sangre humana [121].

La cromatografía de intercambio aniónico ha sido utilizada para la detección de aminoácidos sin derivatizar basado en una reacción entre estos analitos y un compuesto fluorescente de cobre-triptófano ( $\text{Cu(L-Trp)}_2$ ) en la que se monitoriza la disminución de la fluorescencia de dicho compuesto al reaccionar con los aminoácidos [122].

La quimioluminiscencia se ha utilizado para la detección de  $\text{H}_2\text{S}$  en tejidos biológicos, normalmente acoplado a técnicas de separación como la cromatografía de gases. Algunos investigadores han utilizado este método para detección de  $\text{H}_2\text{S}$  libre en tejidos biológicos como tejidos de animal, sangre humana o tejidos celulares por cromatografía de gases [123,124,125,126,127]. En este caso, el analito se descompone en una llama de hidrogeno para dar un dímero de azufre, que posteriormente se descompone emitiendo luz. Esta metodología también se ha aplicado a la determinación de compuestos no volátiles como los aminoácidos de azufre y aminotioles en orina [128]. Para ello, la muestra se trata con borohidruro de sodio con objeto de liberar los aminotioles y posteriormente con isopropil cloroformato para convertirlos en los correspondientes derivados esteres volátiles.

## 1- Introducción

---

Las medidas quimioluminiscentes se han utilizado para la determinación compuestos de azufre en orina y plasma separados previamente en una columna de cromatografía de fase reversa seguido de una reducción online con tris(2-carboxyetil)fosfato y detección final monitorizando la inhibición de la luminiscencia producida cuando el luminol se mezcla con peróxido de hidrógeno [129].

### 1.4.1.3- Espectroscopia de absorción rayos X

La medida de azufre por espectroscopia de absorción de rayos X permite la determinación de especies de azufre en muestras sólidas dado que cada una de éstas presenta diferentes espectros de absorción.

Esta metodología ha sido utilizada para estudiar la cantidad de sulfato intracelular en células vivas procedentes de *A. ceratodes* [130,131] y la estructura de las metaloproteínas en *Saccharomyces cerevisiae* [132]. También se ha utilizado para investigar el estado de oxidación de metabolitos de azufre *in vivo* [133], la bioquímica del azufre en bacterias [134] o la especiación cuantitativa del azufre en glóbulos bacterianos [135].

### 1.4.2- Métodos electroquímicos

#### 1.4.2.1- Potenciometría

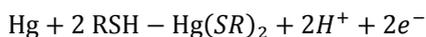
La determinación de azufre utilizando medidas potenciométricas se ha llevado a cabo reduciendo las especies de azufre con un reactivo apropiado y absorbiendo el H<sub>2</sub>S gaseoso formado en una disolución

básica de NaOH, que puede contener también ácido ascórbico o hidracina como agentes antioxidantes, para finalmente determinar el sulfuro formado con un electrodo selectivo. Así, se ha estudiado la concentración de H<sub>2</sub>S en sangre de ratas, cerdos y vacas para dilucidar su importancia en enfermedades cerebrovasculares [136]. También se ha utilizado para investigar el papel del H<sub>2</sub>S como regulador endógeno del tono muscular en truchas [137] o la caracterización de metalotioneinas en la levadura *Yarrowia lipolytica* [138].

La determinación de esteroides que contienen azufre en orina humana se ha podido realizar mediante separación por cromatografía de fase reversa seguido de detección potenciométrica [139]. En este caso, los esteroides no iónicos requerían de una derivatización previa para convertirlos en especies cargadas.

### 1.4.2.2- Amperometría

Los compuestos tiólicos de azufre se pueden monitorizar mediante la voltamperometría de redisolución catódica. Para ello, el electrodo de mercurio se mantiene a un potencial lo suficientemente elevado como para provocar la oxidación del tiol a través de la reacción:

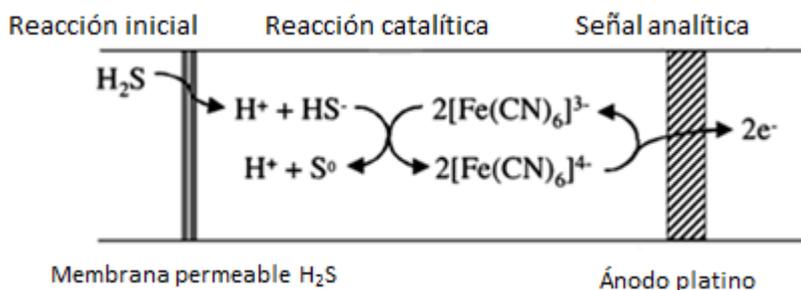


Después de un periodo de deposición, el potencial del electrodo se mueve hacia potenciales más negativos dando lugar a la reducción del ión mercurio. La intensidad de corriente resultante se relaciona con la cantidad de tiol presente en la muestra.

## 1- Introducción

Mediante este método se ha conseguido determinar 14 tioles, incluyendo la cisteína y el glutatión, en suplementos alimenticios [140] o estudiar el glutatión en cultivos celulares de plantas [141].

La monitorización del  $H_2S$  se puede llevar a cabo también empleando sensores amperométricos como el que aparece en la Figura 5.



**Figura 5.** Esquema de amperometría para la medida de  $H_2S$

El desarrollo de sensores amperométricos sensibles y selectivos para el  $H_2S$  ha permitido la medida en continuo y en tiempo real de este compuesto. Así, se ha podido medir los niveles de  $H_2S$  en muestras biológicas como sangre de rata [142,143].

La amperometría se ha utilizado como técnica de detección en cromatografía de fase reversa. De este modo, se han monitorizado penicilina en formulaciones farmacéuticas [144] y antibióticos [145]. También se ha utilizado como sistema de detección en electroforesis capilar en la determinación de aminoácidos, carbohidratos y antibióticos que contienen azufre [146,147].

### **1.4.3- Métodos de espectrometría de masas**

La determinación de compuestos de azufre de forma sensible y específica puede llevarse a cabo utilizando métodos de espectrometría de masas. Por un lado se encuentran las técnicas denominadas como “masas orgánicas”, que engloban metodologías que suelen combinar la cromatografía de líquidos o de gases acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS, GC-MS). En este tipo de métodos se monitorizan fragmentos de los compuestos de azufre producidos en la fuente de ionización con objeto de establecer la estructura y/o masa molecular del compuesto. Estas técnicas utilizan fuentes de ionización de tipo electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), entre otras.

Muchos investigadores han utilizado estas técnicas para el estudio de compuestos de azufre en matrices biológicas. Algunos ejemplos son: la determinación de glutatión en sangre mediante LC-MS [148], taurina en invertebrados marinos utilizando LC-MS/MS [149], metabolitos de azufre en plantas mediante LC-MS/MS [150], fitoquelatinas en plantas [151] o el uso de TOF-MS como herramienta para la confirmación de la exposición al gas mostaza [152].

Por otro lado, la espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS) ofrece una serie de ventajas en la determinación de compuestos de azufre respecto a las metodologías descritas en los anteriores apartados, como podrían ser:

- Su elevada sensibilidad (ppb).
- Su especificidad para la detección del azufre.

## 1- Introducción

---

- Su posible uso para experimentos de marcaje isotópico como estudios de metabolismo y nutrición, dada su capacidad de medir relaciones isotópicas.
- Su versatilidad y fácil acoplamiento con técnicas de separación (HPLC, CE, CG).

Las principales desventajas del empleo del ICP-MS para la medida de azufre son la presencia de interferencias espectrales, en especial especies poliatómicas de oxígeno, que afectan a la medida de los isótopos 32 y 34, y la baja eficiencia de ionización.

Las interferencias espectrales pueden solucionarse utilizando equipos de cuadrupolo con celda de colisión y reacción, aumentando la resolución espectral en un equipo de doble enfoque o, más recientemente, mediante el uso de equipos de triple cuadrupolo.

La eficiencia de ionización del azufre en un plasma de argón es baja, próxima al 10% [153], debido al alto valor de su primer potencial de ionización (10,36 eV). Además, el azufre es relativamente ligero y por tanto no se transmite de una manera tan efectiva como otros iones más pesados, lo que se traduce en una baja sensibilidad en comparación con otros elementos. Afortunadamente, el azufre es un elemento que no suele encontrarse en la mayoría de las muestras en concentraciones inferiores al límite de detección de esta técnica (1-5 ppb).

Dado que esta es la técnica utilizada a lo largo de esta tesis doctoral se explicará a continuación con mayor detalle los distintos tipos de ICP-MS utilizados así como las principales aplicaciones de esta técnica en la medida de azufre y sus compuestos en material biológico.

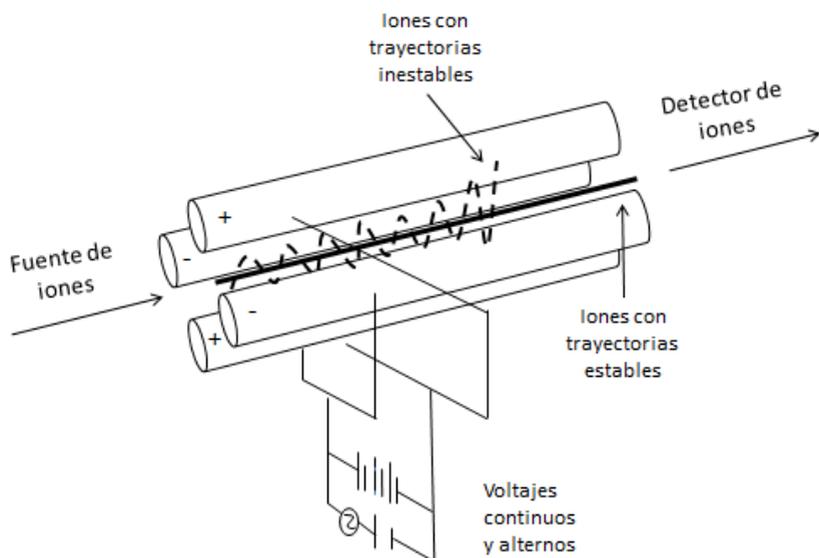
---

## **1.5- El ICP-MS en la determinación de azufre y sus compuestos en material biológico**

### **1.5.1- Instrumentos ICP-MS**

#### **ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción**

En general, los equipos ICP-MS con analizador de masas de tipo cuadrupolo son los equipos más populares debido a su menor coste en comparación con otros instrumentos ICP-MS. El analizador de masas de tipo cuadrupolo está formado por cuatro barras conductoras de secciones hiperbólicas, alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario, tal como se ilustra en la Figura 6. Cada pareja de barras opuestas está conectada eléctricamente y se les aplica una combinación de corriente continua (DC) y corriente alterna de radiofrecuencias (AC). El par de barras positivas (Figura 9) tiende a mantener los iones en el eje central, mientras que el par de barras negativas tiende a alejarlos de dicho eje. A este efecto general se suma el efecto del campo de corriente alterna de modo que los iones describen trayectorias que dependerán de la masa del ion. Para unos determinados valores de los voltajes de corriente continua y alterna solo los iones de una determina  $m/z$  son capaces de describir una trayectoria estable, evitando colisionar con las barras y, por tanto, capaces de pasar el filtro de masas cuadrupolar alcanzando el detector.



**Figura 6.** Esquema de un cuadrupolo en un equipo ICP-MS

Este tipo de espectrómetros presentan una baja resolución espectral ( $m/\Delta m=300$ ). Por tanto, con estos analizadores de masas no es posible separar los isótopos de azufre de los iones poliatómicos de oxígeno que presentan la misma masa nominal que el correspondiente isótopo de azufre.

Una alternativa, dado que el azufre forma fácilmente óxidos estables, es monitorizar el ion molecular ( $SO^+$ ) a las relaciones  $m/z$  48, 49 y 50 que están menos interferidas por iones poliatómicos [154, 155].

Otra posibilidad es el uso de la celda de colisión/reacción. En estos equipos un cuadrupolo, hexapolo u octapolo, se sitúa entre las lentes

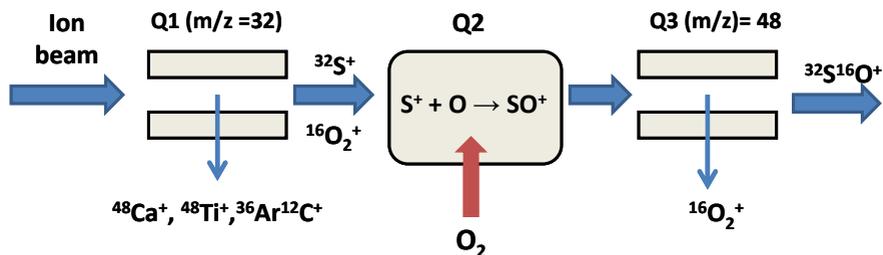
iónicas y el filtro de masas cuadrupolar. La presurización de esta celda con un gas adecuado puede originar reacciones de transferencia de átomos o carga y/o colisiones con procesos de disociación o discriminación de energía que conduzcan a la eliminación de la interferencia espectral.

Utilizando xenón como gas de colisión se eliminan las especies poliatómicas interferentes de  $O_2^+$ . Asimismo, se puede utilizar oxígeno como gas de reacción, monitorizando los óxidos estables de azufre generados en la celda.

Este tipo de ICP se ha utilizado para medir compuestos de azufre en muestras de interés biológico como el estudio del grado de oxidación de la  $\beta$ -caseína mediante el uso de oxígeno en la celda de reacción [156] o la mejora de la precisión en las medidas de azufre en muestras alimenticias. [157]

Recientemente, se han empezado a comercializar equipos de ICP-MS de triple cuadrupolo. Estos equipos tienen dos cuadrupolos (Q1 y Q3) y entre ellos un octapolo que sirve como celda de colisión/reacción (Q2), tal como se puede apreciar en la Figura 7.

En el caso del azufre se seleccionan en el primer cuadrupolo (Q1) las masas de los isotopos de azufre. Solamente los iones seleccionados entran en el octapolo (Q2) y reaccionan con el gas  $O_2$ . En el tercer cuadrupolo se puede seleccionar el ión producto, que para el caso del azufre 32 es  $^{32}S^{16}O^+$ , el cual es separado del ion interferente  $^{16}O_2^+$ . El mismo planteamiento se puede realizar para la medida de los isótopos 33 y 34 del azufre.



**Figura 7.** Esquema de la medida de azufre 32 en un equipo ICP-MS de triple cuadrupolo

La principal diferencia de estos equipos con respecto a los convencionales de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción es la separación previa de las especies que entran en la celda (analito + interferente) evitando así la posible aparición de posibles inferencias como consecuencia de los productos generados en la celda de colisión/reacción.

### **ICP-MS de doble enfoque**

A diferencia de los equipos cuadrupolares, los equipos ICP-MS de doble enfoque (DF) permiten trabajar con resoluciones espectrales regulables (hasta  $m/\Delta m=10.000$ ). En el caso concreto de los isótopos de azufre trabajando a resolución 4.000 es posible la separación espectral de las señales de los iones poliatómicos interferentes (Tabla 3).

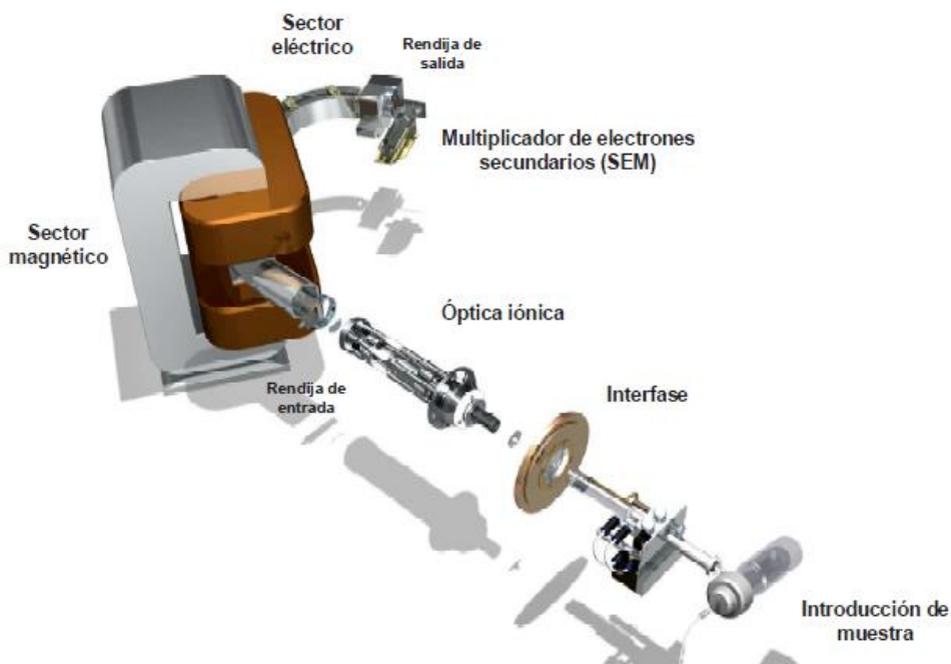
Analito	Masa exacta	Interferencia espectral	Masa interferencia	Resolución necesaria
<b>32S</b>	31,972071	$^{16}\text{O}^{16}\text{O}$	31,989829	1801
		$^{14}\text{N}^{18}\text{O}$	32,002235	1061
		$^{15}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}$	32,002848	1040
		$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}_2$	32,013638	770
<b>33S</b>	32,971458	$^{32}\text{S}^1\text{H}$	32,97989	3907
		$^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}$	32,997654	1259
		$^{14}\text{N}^{18}\text{O}^1\text{H}$	33,010060	854
		$^{15}\text{N}^{18}\text{O}$	32,999269	1186
<b>34S</b>	33,967866	$^{33}\text{S}^1\text{H}$	33,979283	2977
		$^{32}\text{S}^1\text{H}_2$	33,987721	1711
		$^{16}\text{O}^{18}\text{O}$	33,994075	1297
		$^{16}\text{O}^{17}\text{O}^1\text{H}$	34,0018713	1000
		$^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}_2$	34,0054793	904
		$^{15}\text{N}^{18}\text{O}^1\text{H}$	34,0070949	866

**Tabla 3.** Interferencias espectrales para los isótopos de azufre

Estos equipos están provistos de un sistema analizador de masas de doble enfoque, constituido por un sector magnético y un sector electroestático (Figura 8), los cuales separan a los iones de acuerdo a su momento y energía cinética, respectivamente.

## 1- Introducción

---



**Figura 8.** Esquema de un equipo ICP-MS de doble enfoque geometría Nier-Johnson inversa (Obtenido de la página web del fabricante)

En este tipo de analizadores de masas los iones son acelerados a la salida de la fuente sometiéndolos a altísimos potenciales (de hasta 8.000 voltios) mediante una serie de placas electrostáticas que aceleran y enfocan los iones.

La energía cinética de un ion de masa  $m$  y carga  $z$  acelerado dentro de dicho campo vendrá dada por:

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV \quad (1)$$

donde  $V$  es el potencial de aceleración. Así, todos los iones de la misma carga deberían tener la misma energía cinética independiente de la carga. Sin embargo, los iones poseen una distribución estadística de velocidades (tanto en valor como en dirección) que darán lugar a una distribución de energías cinéticas de los iones acelerados que debería afectar a la resolución espectral.

Bajo la acción del potente electroimán del sector magnético, los iones son obligados a describir trayectorias circulares en las que la fuerza centrípeta compensa la fuerza magnética, de acuerdo a:

$$\frac{m v^2}{r} = B z v \quad (2)$$

donde  $r$  es el radio de curvatura y  $B$  el campo magnético. Combinando las ecuaciones (1) y (2) se obtiene:

$$r = \left( \frac{2 m V}{z B^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Así pues, en el sector magnético la trayectoria de un haz de iones con igual momento describe un arco que depende solo del voltaje de aceleración  $V$  y del campo magnético  $B$  del analizador magnético.

Por otro lado, el conjunto de iones que sale de la fuente con la misma relación  $m/z$  pero con una distribución direccional algo divergente son afectados por el campo magnético de tal manera que se produce una distribución direccional convergente cuando los iones dejan el campo. Sin embargo, la distribución de energías traslacionales de los iones que dejan la fuente limita seriamente la resolución de los instrumentos de sector magnético ( $m/\Delta m < 2.000$ ). Es decir, esta distribución de energías cinéticas produce un ensanchamiento del haz que llega al detector y por tanto una pérdida de resolución.

## 1- Introducción

---

Este problema se corrige con el empleo de un sector electrostático constituido por dos láminas metálicas lisas curvadas a las que se aplica un potencial de corriente continua. En este caso la fuerza centrípeta debe compensar a la fuerza del campo eléctrico de acuerdo a:

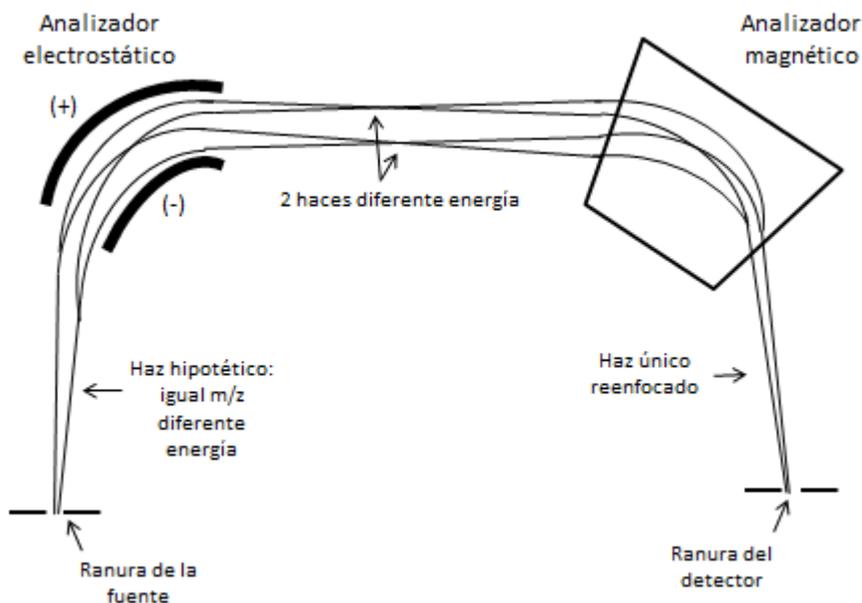
$$\frac{m v^2}{r} = z E \quad (4)$$

donde E es el campo eléctrico. Combinando las ecuaciones 1 y 4 se obtiene:

$$r = \frac{2V}{E} \quad (5)$$

En el sector electrostático la trayectoria de un haz de iones con igual energía cinética describe un arco que depende solo del voltaje de aceleración V y del campo eléctrico E.

De este modo, los iones de una determinada m/z son doblemente enfocados (enfoque direccional o angular y de energía) a la salida de la combinación de los dos sectores para un potencial de aceleración y fuerzas de campo magnético y eléctrico dados (Figura 9). Dicho de otro modo los iones de la misma relación m/z serán enfocados en un mismo punto garantizando así un alto poder de resolución (regulable por medio de la rendija de entrada y salida) y elevada sensibilidad cuando se trabaja a baja resolución (a medida que aumenta la resolución disminuye la sensibilidad de estos equipos).



**Figura 9.** Óptica iónica de doble enfoque con geometría directa

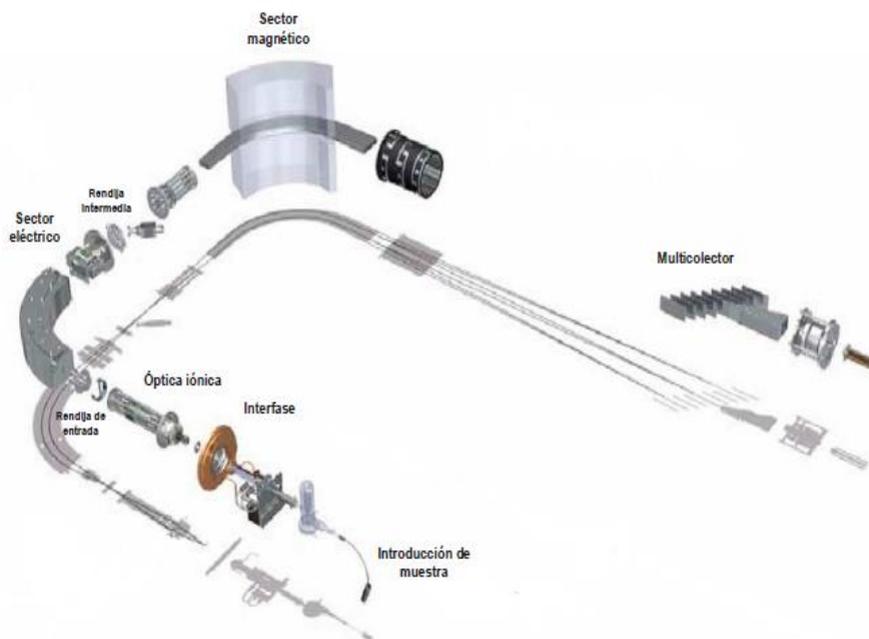
En el caso de azufre, como ya se ha comentado, mediante el empleo de una resolución 4.000 se consiguen separar los isótopos de azufre de los iones poliatómicos interferentes.

Los instrumentos de doble enfoque se utilizan tanto en equipos secuenciales con un único detector (habitualmente un multiplicador de electrones secundarios) como multicolector, esto es, con varios detectores de copa de Faraday que permiten monitorizar la señal de varios iones simultáneamente (Figura 10). Los equipos multicolectores permiten obtener medidas de relaciones isotópicas muy precisas ya que

## 1- Introducción

---

al medirse los dos isótopos simultáneamente se anula el efecto de las fluctuaciones de la fuente.



**Figura 10.** Esquema de un equipo ICP-MS multicolector enfoque (Obtenido de la página web del fabricante)

El equipo multicolector se ha utilizado para la determinación de azufre total en muestras biológicas [158] o la caracterización de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$  [96]. Este equipo también se ha utilizado en la determinación de relaciones isotópicas de azufre para el control de falsificaciones de productos farmacéuticos [159].

## **1.5.2- Técnicas híbridas**

A continuación se expondrán algunas de las técnicas híbridas acopladas a los equipos ICP-MS que se han utilizado para determinar compuestos de azufre en muestras biológicas.

### **1.5.2.1- Cromatografía Líquida (LC-ICP-MS)**

El acoplamiento de la cromatografía de líquidos con el ICP-MS (LC-ICP-MS) es la técnica utilizada habitualmente para la especiación de azufre en muestras biológicas [160].

La cuantificación de péptidos y proteínas de azufre mediante HPLC-ICP-MS ofrece un método alternativo para la proteómica cuantitativa. Conociendo el número de aminoácidos de azufre de una proteína puede calcularse la cantidad de proteína midiendo el azufre presente en la misma, incluso en ausencia de estándares de proteínas certificadas. El único requisito para ello es que la respuesta de azufre en el ICP-MS sea independiente de la forma química en la que el azufre es introducido en el plasma (calibración independiente del compuesto) [161]. La presencia de al menos un residuo de azufre (metionina o cisteína) se ha utilizado para la determinación del grado de fosforilación en fosforproteínas y fosfopéptidos monitorizando la relación  $^{31}\text{P}/^{32}\text{S}$  [162].

Dentro del campo de la proteómica, el estudio de las metaloproteínas ha centrado el interés de muchos grupos de investigación ya que aproximadamente un tercio de todas las proteínas requieren metales para llevar a cabo sus funciones. El metal suele estar coordinado por átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre pertenecientes a los

## 1- Introducción

---

aminoácidos de la cadena polipeptídica. La detección simultánea de azufre y otros metales en muestras biológicas puede ayudar a descubrir la estequiometría de muchas metaloproteínas y otros compuestos biológicos relevantes [163]. Así, se han determinado las relaciones S/Cu en proteínas plasmáticas de sujetos sanos y pacientes con enfermedad de Wilson [164] y se ha realizado la especiación simultánea de S y Se en plantas *Allium* por HPLC acoplada a un ICP-MS con celda de reacción monitorizando el isótopo 34 [165].

Por otro lado, el acoplamiento HPLC-ICP-MS también se ha utilizado en el campo de la medicina para estudiar los efectos de terapias con drogas en el tratamiento de enfermedades. Así, se ha investigado el destino metabólico de xenobióticos clorinados mediante la detección específica de S y Cl [166] o metabolitos de la droga omeoprazol en orina de rata [167]. Por otro lado, es bien conocido que las drogas que contienen Pt o Ru, usadas como drogas anticancerígenas, muestran una fuerte afinidad por sustancias que contengan tioles (por ejemplo, aminoácidos de S). Las interacciones de estas drogas con las proteínas de azufre han sido estudiadas monitorizando simultáneamente el metal y el azufre [168,169].

El acoplamiento HPLC-ICP-MS también se ha utilizado en estudios de marcaje isotópico utilizando tanto el  $^{33}\text{S}$  como el  $^{34}\text{S}$ . Así, se ha utilizado sulfato o metionina enriquecidos en azufre 34 para el seguimiento de la síntesis de proteínas [170,171]. En nuestro grupo de investigación se ha sintetizado levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$  [96], la cual se han utilizado posteriormente como marcador en el estudio del metabolismo de azufre en animales [81]. Además, la aparición del ICP-MS de triple cuadrupolo abriría la posibilidad de utilizar también el  $^{36}\text{S}$  como

marcador ya que esta técnica permite eliminar la interferencia del  $^{36}\text{Ar}$  [172].

### 1.5.2.2- Cromatografía de gas (GC-ICP-MS)

La cromatografía de gases acoplada al ICP-MS puede ser utilizada para monitorizar compuestos de azufre volátiles o no volátiles tras un proceso de derivatización. La ausencia de agua en el plasma reduce notablemente las interferencias espectrales que afectan al azufre en el ICP-MS, permitiendo el uso de la masa 32 para la medida del azufre. La mayoría de especies volátiles de azufre son térmicamente estables y pueden ser detectadas usando un ICP-MS. Sin embargo, pocas aplicaciones se centran en el estudio de estos compuestos en materiales biológicos. Uno de ellos es la determinación de compuestos volátiles de azufre (VSCs) en aliento humano mediante GC-ICP-MS [173]. Los mismos autores desarrollaron un método selectivo y sensible para la determinación total de homocisteína en suero humano mediante GC-ICP-MS utilizando ácido trifluoroacético como reactivo derivatizante [174].

### 1.5.2.3- Ablación laser (LA-ICP-MS)

El acoplamiento LA-ICP-MS permite el análisis rápido y directo de sólidos, con una mínima preparación de muestra, así como obtener información espacial [175].

Mediante el empleo de esta técnica se puede monitorizar el azufre junto con otros elementos como el fósforo en las manchas obtenidas en la separación de proteínas mediante electroforesis convencional de

geles [176,177]. La técnica LA-ICP-MS ha sido satisfactoriamente aplicada también como técnica de “imaging” para producir imágenes cuantitativas de la distribución específica de uno o varios elementos en secciones de tejidos [178, 179]. Así, este método se ha utilizado para la visualización en 2D del azufre en una sección de cerebro de rata con objeto de detectar tumores de pequeño tamaño [180]. También se ha aplicado a la visualización en 2D del azufre y otros elementos en secciones del hipocampo del cerebro humano [181].

### 1.5.2.4- Electroforesis capilar (CE-ICP-MS)

El acoplamiento CE-ICP-MS es considerada como una potente herramienta para el análisis de proteínas que contengan metales ligados a ellas [182], pudiéndose monitorizar, como en los casos anteriores, simultáneamente al metal el azufre y, de este modo, confirmar la presencia de una proteína en el compuesto eluido. Las metalotioneinas han sido las proteínas más comúnmente analizadas con CE-ICP-MS [183]. Son proteínas pequeñas que contienen cisteína y que pueden enlazarse con cationes como  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  o  $Cu^{2+}$  [184,185]. También se ha utilizado para la determinación de aminoácidos de azufre en orina y complementos nutritivos [186].

## **1.6- Análisis por dilución isotópica**

El análisis por dilución isotópica (IDA) se basa en la medida de relaciones isotópicas de un elemento en muestras donde su composición isotópica ha sido previamente alterada por la adición de una cantidad conocida del elemento o compuesto que contiene el elemento enriquecido isotópicamente. Se emplea principalmente en la certificación de patrones y/o materiales de referencia, así como en la validación de otros métodos analíticos. Sin embargo, en los últimos años, debido al coste relativamente bajo de los isótopos enriquecidos, la facilidad de manejo, rapidez y robustez analítica de las metodologías analíticas basadas en la dilución isotópica y a la comercialización cada vez más extendida de compuestos marcados isotópicamente, se está popularizando su uso en análisis de rutina.

La dilución isotópica se usa casi exclusivamente con las técnicas de espectrometría de masas. Inicialmente se utilizaron los equipos con fuente de ionización térmica (TIMS) para análisis elemental debido a las altas precisiones que se obtenían. Sin embargo, debido a la complejidad en el tratamiento de la muestra, poco a poco esta técnica se vio desplazada por el plasma de acoplamiento inductivo [187].

El análisis por dilución isotópica se puede aplicar no solo al análisis elemental sino también a la determinación de compuestos. En el campo de la química clínica, la necesidad de una correcta determinación de fármacos, drogas, etc., junto con la disponibilidad de diferentes compuestos marcados con  $^2\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ , ha acelerado el uso esta técnica y generalmente se utiliza como referencia para validar otras metodologías utilizadas en análisis rutinarios más sencillos [188].

## 1- Introducción

---

La dilución isotópica se ha utilizado ampliamente en el campo de la especiación elemental, donde el propósito es la determinación de las especies químicas individuales en las que un elemento se distribuye en una muestra dada [189,190].

Esta técnica presenta una serie de ventajas respecto a otras metodologías:

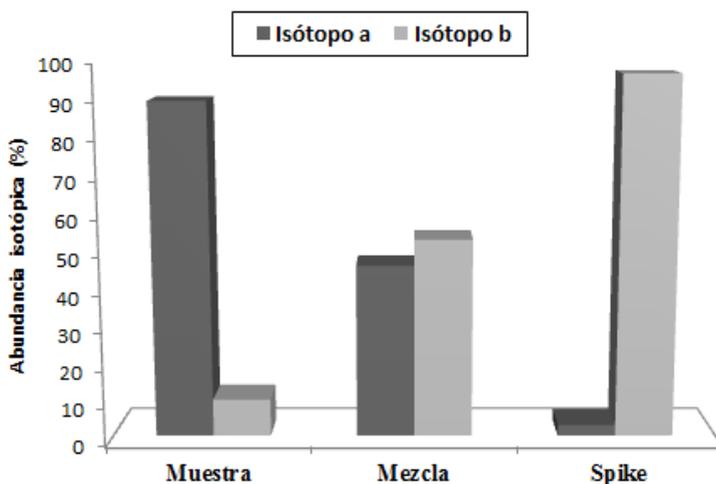
- La utilización de un isótopo de un mismo elemento para realizar medidas analíticas constituye una estandarización interna ideal ya que permite corregir tanto las posibles derivas instrumentales como las interferencias de matriz.
- Una vez añadido y mezclado homogéneamente el isótopo enriquecido con el elemento presente en la muestra, el análisis por dilución isotópica permite la utilización de procesos de separación no cuantitativos.
- Con el análisis por dilución isotópica se obtienen resultados de una alta precisión y exactitud. Así, los métodos que emplean análisis por dilución isotópica son considerados métodos absolutos de cuantificación adecuados por tanto para su uso como referencia en la validación de otras metodologías analíticas.

Sin embargo, para obtener de una elevada exactitud es necesario corregir efectos como la discriminación de masas o el tiempo muerto del detector y los isótopos a monitorizar deben estar libres de interferencias espectrales. Además, el método no es aplicable a elementos monoisotópicos.

### 1.6.1- Principios básicos

El análisis por dilución isotópica está basado en la alteración de las abundancias isotópicas de un elemento endógeno en una muestra mediante la adición de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido del mismo elemento (*spike*). Por lo tanto, el elemento a analizar tiene que poseer al menos dos isótopos estables que puedan ser monitorizados en un espectrómetro de masas.

El principio básico de un análisis elemental mediante IDA para el caso de un elemento que contiene dos isótopos diferentes a y b, se ilustra en la Figura 11.



**Figura 11.** Ilustración del fundamento de la dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos (a y b).

## 1- Introducción

---

Como se puede observar, el isótopo a es el más abundante en la muestra, mientras que el spike está enriquecido en el isótopo b. Al realizar la mezcla de ambos se obtiene una relación que será intermedia entre muestra y spike, y que dependerá de la cantidad de spike añadido y de la cantidad inicial del elemento en la muestra. La relación en la mezcla puede expresarse matemáticamente mediante la ecuación de la dilución isotópica.

### **1.6.2- Ecuación de la dilución isotópica**

Esta ecuación será expresada siguiendo la notación utilizada por J. I. García Alonso [191]. Si  $N_s$  representa el número de moles de un elemento poliatómico en la muestra y  $N_{sp}$  los moles del mismo elemento en el spike, los números de moles de ese elemento en la mezcla resultante,  $N_m$ , pueden expresarse como:

$$N_m = N_s + N_{sp} \quad (1)$$

Similares balances de masa pueden ser obtenidos para los isótopos a y b:

$$N_m^a = N_s^a + N_{sp}^a \quad (2)$$

$$N_m^b = N_s^b + N_{sp}^b \quad (3)$$

Si se divide la ecuación (2) entre la ecuación (3), se obtiene la relación isotópica de los dos isótopos (a/b) en la mezcla  $R_m$ :

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_{sp}^a}{N_s^b + N_{sp}^b} = \frac{N_s A_s^a + N_{sp} A_{sp}^a}{N_s A_s^b + N_{sp} A_{sp}^b} \quad (4)$$

Donde,  $N_s^a = N_s A_s^a$ ,  $N_{sp}^a = N_{sp} A_{sp}^a$ ,  $N_s^b = N_s A_s^b$  y  $N_{sp}^b = N_{sp} A_{sp}^b$  teniendo en cuenta la abundancia isotópica de los isótopos a y b en la muestra ( $A_s^a$  y  $A_s^b$ ) y en el *spike* ( $A_{sp}^a$  y  $A_{sp}^b$ ). De modo arbitrario, se establece que el isótopo a será el mayoritario en la muestra y el isótopo b sea el mayoritario en el *spike*.

Reordenando la ecuación (4) para  $N_s$ , se obtiene:

$$N_s = N_{sp} \frac{R_m A_{sp}^b - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (5)$$

La ecuación (5) es la forma más básica de la ecuación de la dilución isotópica. Si se conocen el número de moles añadidos con el *spike* y la composición isotópica de la muestra y el *spike*, se puede calcular el número de moles en la muestra midiendo únicamente  $R_m$  en la mezcla. Esta expresión se puede adaptar para expresar concentraciones (masa/masa) en vez del número de moles. Se define  $R_s = A_s^b/A_s^a$  como la relación isotópica b/a en la muestra y  $R_{sp} = A_{sp}^b/A_{sp}^a$  como la relación isotópica b/a en el *spike*. De esta forma, la ecuación (5) puede expresarse como:

$$N_s = N_{sp} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \quad (6)$$

La ecuación (6) puede convertirse a unidades de concentración utilizando la expresión  $N_s = (C_s m_s)/(M_s)$  y  $N_{sp} = (C_{sp} m_{sp})/(M_{sp})$ , siendo:

- $C_s$  y  $C_{sp}$  las concentraciones del elemento en la muestra y el *spike* respectivamente

## 1- Introducción

---

- $m_s$  y  $m_{sp}$  las masas tomadas de la muestra y el *spike* respectivamente
- $M_s$  y  $M_{sp}$  la masa atómica del elemento en la muestra y el *spike* respectivamente

Sustituyendo, la ecuación final de la dilución isotópica es:

$$C_s = C_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (7)$$

En esta ecuación, la concentración del elemento en la muestra se determina midiendo la relación isotópica (b/a) en la mezcla ( $R_m$ ) mediante espectrometría de masas, ya que los otros parámetros en la ecuación son conocidos.

### **1.6.3- La dilución isotópica para la especiación elemental**

Los equipos ICP-MS no son capaces de proporcionar información sobre las diferentes formas químicas, físicas o morfológicas en las que el elemento de interés se encuentra en una muestra determinada. Por tanto, a la hora de aplicar el análisis por dilución isotópica en el campo de la especiación elemental, se necesita una separación previa de las distintas especies a determinar antes de la medida con el espectrómetro de masas. Así pues, para obtener información molecular es preciso acoplar alguna técnica de separación, normalmente cromatográfica.

Para adaptar la técnica de dilución isotópica al campo de la especiación se puede emplear dos estrategias: (i) dilución isotópica específica y (ii)

dilución isotópica inespecífica o post-columna. Ambos modos se diferencian en el momento en el que se añade el trazador isotópico y en la forma química de este último.

### 1.6.3.1- Dilución isotópica específica

La modalidad específica requiere el uso de un spike que contenga la especie a analizar enriquecida isotópicamente en un determinado elemento. La composición y estructura de la especie de interés debe ser perfectamente conocida con objeto de poder sintetizar la correspondiente especie enriquecida o adquirirla si está disponible comercialmente.

En este modo, la disolución spike se añade a la muestra al principio del proceso analítico, debiendo asegurarse la mezcla homogénea de la especie enriquecida con la especie de abundancia natural (el mal llamado equilibrio isotópico).

En los últimos años muchos grupos de investigación han sintetizado compuestos enriquecidos isotópicamente (trazadores) para el estudio de compuestos de interés en el campo de la medicina, bioquímica o medioambiente [88,192].

Durante la presente tesis doctoral se sintetizó metionina enriquecida en azufre 34 para la determinación de metionina de abundancia natural en suplementos alimenticios y plasma humano.

### 1.6.3.2- Dilución isotópica inespecífica o post-columna

En esta modalidad, la adición del isótopo trazador o spike se lleva a cabo en línea tras la completa separación cromatográfica de las especies de abundancia natural en la muestra (adición post-columna). El spike suele encontrarse como especie diferente de la especie a determinar.

Esta técnica es especialmente útil cuando la estructura o composición de las especies a analizar no se conocen con exactitud o cuando no se disponen de compuestos enriquecidos comercialmente o no pueden ser sintetizados. Obviamente, cualquier pérdida del analito antes de la mezcla con el trazador no es corregida mediante este método. Además, esta modalidad sólo puede ser utilizada cuando la eficiencia de ionización del elemento es independiente de la forma química en el que el elemento esté presente en la fuente de ionización.

La adición continua de la disolución de spike se lleva a cabo mezclando de manera continua a la salida de la columna cromatográfica el spike utilizando una bomba peristáltica y una pieza de T. Para la cuantificación de los compuestos eluidos es necesario representar el flujo másico frente al tiempo de retención. El flujo másico es la masa eluida de un compuesto por unidad de tiempo. De este modo, la concentración de las diferentes especies en la muestra, se calculan mediante la integración de los picos cromatográficos (masa total eluida) y división por el volumen de muestra inyectada.

Es necesario modificar la ecuación de la dilución isotópica para adecuarla a esta modalidad. Tras la separación cromatográfica, el eluyente de la columna que contiene  $N_s$  moles ( $\text{mol g}^{-1}$ ) de un elemento de la muestra, con una densidad  $d_s$  (en  $\text{g mL}^{-1}$ ) y es bombeado con un

flujo  $f_s$  ( $\text{mL min}^{-1}$ ) para mezclarse con una disolución de spike que contiene  $N_{sp}$  moles del trazador ( $\text{mol g}^{-1}$ ) con una densidad  $d_{sp}$  (en  $\text{g mL}^{-1}$ ) y es bombeado a un flujo  $f_{sp}$  ( $\text{mL min}^{-1}$ ). El flujo másico total ( $\text{mol min}^{-1}$ ) para dos isótopos a y b del elemento en la mezcla será:

$$N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp} = N_m^a d_m f_m \quad (8)$$

$$N_s^b d_s f_s + N_{sp}^b d_{sp} f_{sp} = N_m^b d_m f_m \quad (9)$$

Dividiendo la ecuación (8) entre la ecuación (9) se obtiene la siguiente expresión:

$$R_m = \frac{N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp}}{N_s^b d_s f_s + N_{sp}^b d_{sp} f_{sp}} = \frac{N_s A_s^a d_s f_s + N_{sp} A_{sp}^a d_{sp} f_{sp}}{N_s A_s^b d_s f_s + N_{sp} A_{sp}^b d_{sp} f_{sp}} \quad (10)$$

Donde  $R_m = (N_m^a)/(N_m^b)$  es la relación isotópica (a/b) en la mezcla y  $N_s^a = N_s A_s^a$ ,  $N_{sp}^a = N_{sp} A_{sp}^a$ ,  $N_s^b = N_s A_s^b$ ,  $N_{sp}^b = N_{sp} A_{sp}^b$  teniendo en cuenta las abundancias de los isótopos a y b en la muestra ( $A_s^a$  y  $A_s^b$ ) y en el spike ( $A_{sp}^a$  y  $A_{sp}^b$ ) respectivamente.

Reordenando la ecuación (10) para  $N_s$  se obtiene:

$$N_s d_s f_s = N_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{R_m A_{sp}^b - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (11)$$

La ecuación (11) es la ecuación básica para la dilución isotópica con adición on-line. Esta ecuación puede ser modificada utilizando  $R_s = A_s^b/A_s^a$  como la relación isotópica b/a en la muestra y  $R_{sp} = A_{sp}^b/A_{sp}^a$  como la relación isotópica b/a en el spike, de tal forma que se obtiene:

## 1- Introducción

---

$$N_s d_s f_s = N_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \quad (12)$$

Donde  $N_s$  y  $N_{sp}$  son las concentraciones del elemento ( $\text{mol g}^{-1}$ ) en la muestra y el spike respectivamente. Si se tiene en cuenta el peso atómico de los elementos la concentración se puede expresar en unidades de masa:

$$C_s d_s f_s = C_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (13)$$

Donde  $C_s$  y  $C_{sp}$  son las concentraciones del elemento en la muestra y el spike, y  $M_s$  y  $M_{sp}$  son los pesos atómicos del elemento en la muestra y el spike respectivamente.

Si la concentración se expresa en  $\text{ng g}^{-1}$ , la expresión  $C_s d_s f_s$  tiene unidades de  $\text{ng min}^{-1}$  y corresponde al flujo másico de la muestra que eluye de la columna  $MF_s$ . Por lo tanto, la ecuación de la dilución isotópica post-columna se puede expresar como:

$$MF_s = C_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{AW_s}{AW_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (14)$$

Si la concentración del analito cambia con el tiempo, por ejemplo durante un pico cromatográfico,  $MF_s$  también cambiará su valor. La integración del pico en el cromatograma de flujo másico aportará la cantidad del elemento eluido en dicha fracción. La concentración se puede calcular fácilmente dividiendo por el volumen de muestra inyectado.

Este procedimiento se utilizó en la presente tesis doctoral para la cuantificación de metabolitos de azufre excretados en la orina de ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata.

### **1.6.4- Deconvolución de perfiles isotópicos**

La deconvolución de perfiles isotópicos es una técnica matemática para aislar diferentes señales isotópicas de una mezcla de abundancia natural y trazadores enriquecidos. Esta técnica se basa en la regresión lineal múltiple.

Esta forma de operar en análisis por dilución isotópica presenta una serie de ventajas respecto a las ecuaciones usadas tradicionalmente. Por un lado, es una metodología general que se puede aplicar a cualquier sistema en el que se utilicen elementos o compuestos marcados isotópicamente, tanto para dilución isotópica elemental como orgánica o bioquímica. Por otro lado, permite el trabajo con múltiples perfiles isotópicos, lo cual es necesario cuando se pretenden realizar estudios fundamentales de metabolismo mineral y de especiación.

Esta metodología permite, por ejemplo, utilizar un isótopo enriquecido metabólico (añadido al organismo en estudio) y otro isótopo distinto para la cuantificación final por dilución isotópica

En general, cuando se quiere determinar mediante análisis por dilución isotópica, en cualquiera de sus modalidades, la cantidad de materia de un elemento o compuesto químico de abundancia isotópica natural (en moles,  $N_{\text{nat}}$ ) presente en una determinada alícuota de la muestra, se

## 1- Introducción

---

añade a dicha alícuota una cantidad conocida de materia enriquecida isotópicamente (en moles,  $N_{enr}$ ) del elemento o compuesto a determinar. La mezcla ( $N_m$ ) entre el elemento o compuesto de abundancia isotópica natural y el enriquecido isotópicamente, cumplirá el balance de masas:

$$N_m = N_{nat} + N_{enr} \quad (15)$$

El balance de masas de la ecuación (15) se puede hacer también para todos y cada uno de los isótopos/masa que configuran el perfil isotópico del elemento o compuesto determinado. Por ejemplo, para un isótopo cualquiera  $i$  de un elemento el balance de masas sería:

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{enr}^i \quad (16)$$

Si se tratase de un compuesto químico, la ecuación 16 representaría el balance de masas para una masa determinada de su perfil isotópico molecular. Ya sea para un elemento o un compuesto, la ecuación 16 se puede expresar como una combinación lineal de la cantidad total del elemento o compuesto en cada uno de los perfiles isotópicos (natural o enriquecido) y de las abundancias isotópicas conocidas o medidas de cada perfil isotópico según:

$$N_m A_m^i = N_{nat} A_{nat}^i + N_{enr} A_{enr}^i \quad (17)$$

donde  $A_m^i$ ,  $A_{nat}^i$  y  $A_{enr}^i$  son las abundancias isotópicas conocidas o medidas del isótopo/masa  $i$  en cada uno de los perfiles isotópicos. Si dividimos la ecuación 17 por la ecuación 15 se obtiene la siguiente expresión matemática

$$A_m^i = X_{nat} A_{nat}^i + X_{enr} A_{enr}^i \quad (18)$$

donde,

$$X_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat}+N_{enr}} \quad \text{y} \quad X_{enr} = \frac{N_{enr}}{N_{nat}+N_{enr}}$$

son las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos que contribuyen al perfil isotópico observado en la muestra alterada isotópicamente. La ecuación final de la dilución isotópica se obtiene al dividir estas dos últimas expresiones:

$$\frac{N_{nat}}{N_{enr}} = \frac{X_{nat}}{X_{enr}} \quad (19)$$

Por tanto, dado que  $N_{enr}$  es conocido, para calcular la cantidad de materia en la muestra ( $N_{nat}$ ) únicamente se tiene que determinar experimentalmente las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos presentes en la mezcla.

Si el elemento utilizado posee al menos 2 isótopos estables (o el compuesto utilizado posee al menos 2 masas en su perfil isotópico molecular) podemos definir una ecuación de abundancias isotópicas y fracciones molares (ecuación 18) para cada isótopo/masa. Supongamos que el elemento/compuesto posee  $n$  isótopos estables (o masas en su distribución isotópica molecular) donde  $n \geq 2$ . Esa serie de ecuaciones se puede expresar, en notación matricial, como:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{enr}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{enr}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{enr}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{enr}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{enr}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{enr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (20)$$

## 1- Introducción

---

En el caso de  $n > 2$  tenemos más ecuaciones que incógnitas (fracciones molares) y se ha de incluir un vector de error en la ecuación 20. Los valores de las incógnitas  $X_{nat}$  y  $X_{enr}$  y su incertidumbre se obtienen mediante ajuste por mínimos cuadrados del vector de error utilizando la técnica de mínimos cuadrados múltiple lo que se puede calcular utilizando la función “Estimación Lineal” en Excel. El proceso de calcular las fracciones molares en sistemas como el que aparece en la ecuación 20, se viene denominando “Deconvolución de Perfiles Isotópicos” en la literatura moderna.

Esta metodología se utilizó en la presente tesis doctoral, empleando el azufre 34 como trazador metabólico, y azufre 33 para la cuantificación final.

---

## **2-Objetivos**

---

Como se ha comentado previamente, la búsqueda de nuevos biomarcadores de enfermedades en general y tumores malignos en particular es uno de los grandes campos de investigación clínica. De los diferentes tejidos y fluidos que pueden ser objeto de análisis, la orina constituye una muestra ideal para la monitorización de estas sustancias dado que no requiere de métodos invasivos. Además, los perfiles metabolómicos en orina están siendo objeto de investigación para desarrollar nuevos ensayos clínicos basados en este tipo de biomarcadores.

Por otro lado, las técnicas híbridas que combinan potentes técnicas de separación cromatográficas o electroforéticas con la espectrometría de masas en general y la espectrometría de masas con fuente ICP en particular abre la posibilidad de nuevas estrategias analíticas dentro de este campo.

En nuestro caso, basándonos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, pretendemos evaluar la posibilidad de utilizar las medidas de relaciones isotópicas de azufre en los metabolitos presentes en la orina como método para detectar pacientes con determinadas patologías como por ejemplo cáncer de próstata. La hipótesis sería la siguiente: al suministrar una dosis de levadura en  $^{34}\text{S}$  a un individuo sano y a un paciente, si el metabolismo de estos individuos es diferente como consecuencia de la enfermedad, debería observarse la aparición de un enriquecimiento isotópico en azufre diferente en algunos de los metabolitos de azufre presentes en la orina de estos individuos. El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar si esto es así o no, ya que en caso afirmativo estos metabolitos podrían proponerse como posibles biomarcadores de la enfermedad.

## 2- Objetivos

---

Este objetivo general se concreta en una serie de objetivos parciales:

### **1. Síntesis de levadura enriquecida en azufre 34.**

Se procederá a sintetizar levadura *Saccharomyces Cerevisiae* enriquecida en azufre 34. Para ello se partirá de la experiencia previa en nuestro grupo de investigación en este campo, pero modificando y optimizando algunos aspectos de los métodos anteriormente desarrollados con objeto de obtener un enriquecimiento mayor en el isótopo 34 del azufre. Esta levadura será empleada en las etapas posteriores. Como en ocasiones previas se colaborará con el grupo del profesor Fernando Moreno en cuyos laboratorios se llevarán a cabo la síntesis de las levaduras enriquecidas.

Por otro lado, se aprovechará también estas levaduras para preparar un patrón de metionina enriquecida isotópicamente con objeto de utilizarla en la determinación de metionina en muestras de interés clínico. Para ello, se colaborará con el Hospital Universitario Central de Asturias tanto en la obtención de muestras clínicas como en la validación de nuestra metodología por comparación con la empleada en los laboratorios del Hospital.

### **2. Desarrollo de una metodología analítica cuantitativa para la monitorización de metabolitos de azufre en orina**

Es de esperar que los enriquecimientos isotópicos de azufre en los metabolitos presentes en la orina tras una dosis única de levadura enriquecida sean muy pequeños. Para poder detectar diferencias entre individuos sanos y enfermos será necesario utilizar técnicas que alcancen una alta precisión en la medida de las relaciones isotópicas. Por tanto, se compararan dos equipos de ICP-MS de doble enfoque, uno

con detección secuencial y otro con detección simultánea, fundamentalmente en lo que se refiere a la precisión en la medida de relaciones isotópicas.

Por otro lado, se pondrá a punto un método de HPLC para separar los principales metabolitos de azufre en orina comparando distintos tipos de cromatografía (cambio iónico y fase reversa). Además, con objeto de cuantificar el azufre endógeno y exógeno (enriquecido isotópicamente) presente en cada pico cromatográfico se añadirá en continuo a la salida de la columna cromatográfica un segundo trazador enriquecido en el isótopo 33 del azufre y se aplicará la herramienta matemática de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) desarrollada previamente en nuestro grupo de investigación.

### **3. Evaluación del enriquecimiento isotópico de azufre en orina de animales de laboratorio tras suministrarles una dosis de levadura enriquecida.**

Para este último objetivo, se alimentará con una dosis única de levadura enriquecida a ratas y/o ratones de laboratorio para recoger posteriormente la orina y analizarla por el método analítico puesto a punto anteriormente. Se establecerán dos poblaciones, una de individuos sanos y otra con cáncer de próstata, y se les hará un seguimiento con el tiempo suministrando a los individuos dosis puntuales de levadura enriquecida en determinados momentos espaciados regularmente. Los animales se mantendrán en jaulas metabólicas para poder recoger la orina excretada evaluándose el tiempo idóneo para la recogida de las mismas tras la administración de la dosis de levadura enriquecida.

Para el tratamiento de los datos se utilizarán técnicas quimiométricas, tanto para lo que se refiere a la identificación de los compuestos que

## 2- Objetivos

---

presentan un comportamiento distinto en ambas poblaciones como para establecer diferencias globales entre las mismas (reconocimiento de pautas).

---

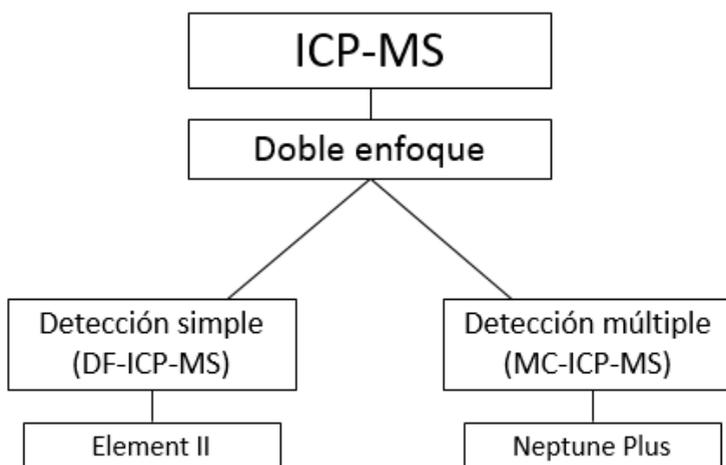
## **3- Experimental**

---

## **3.1- Instrumentación**

### **3.1.1- Espectrómetros de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)**

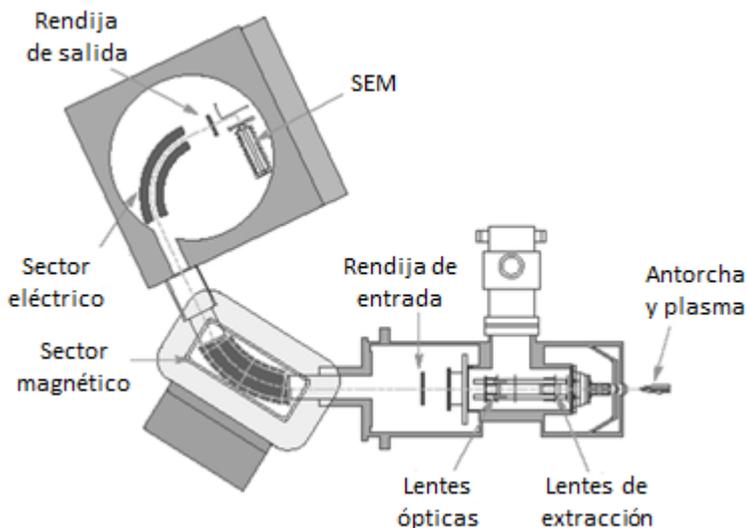
A lo largo de esta Tesis Doctoral se han empleado dos equipos ICP-MS con distintas configuraciones para la detección específica de azufre. Los modelos de ICPMS utilizados se recogen en la Figura 12. En ambos casos se trata de equipos de ICP-MS con analizadores de masas de doble enfoque, uno con detección simple (Element 2), y otro con detección múltiple (Neptune Plus).



**Figura 12.** Equipos ICP-MS utilizados durante esta tesis doctoral

#### ICP-MS de doble enfoque con detección simple

El equipo de ICP-MS de doble enfoque con detección simple utilizado es de la casa comercial Thermo Instruments, modelo Element 2, instalado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. La Figura 13 recoge un esquema con las características más significativas de este equipo.



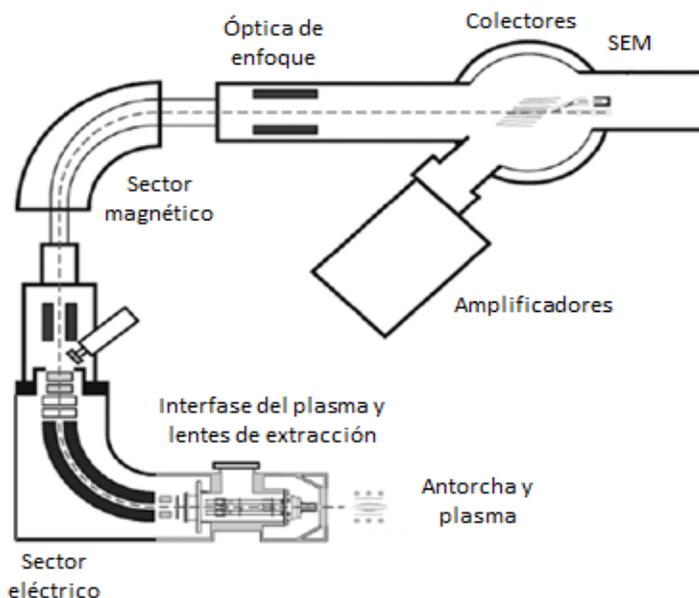
**Figura 13.** Esquema del equipo ICP-MS doble enfoque con detección simple Element II (obtenido de la página web del fabricante)

Este instrumento está equipado, por defecto, con un nebulizador concéntrico tipo Meinhard, una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott sin refrigeración y una antorcha de cuarzo tipo Fassel, con un canal central (tubo inyector) de 1 mm de diámetro interno. Los conos

de la interfase de extracción (“sampler”) y muestreo (“skimmer”) son de níquel, con un diámetro de 1 mm y 0,7 mm, respectivamente. El equipo tiene un detector multiplicador de electrones secundarios (SEM) que opera de forma dual (analógico y pulsos).

### **ICP-MS de doble enfoque con detección múltiple**

Para la medida de relaciones isotópicas de azufre de elevada precisión se empleó el equipo MC-ICP-MS modelo Neptune Plus (Thermo Instruments, Bremen, Alemania) instalado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Un esquema de este instrumento se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Esquema del equipo ICP-MS de doble enfoque multicolector Neptune Plus (obtenido de la página web del fabricante)

El sistema de introducción de muestras está formado por un nebulizador microconcéntrico de PFA (perfluoroalcoxi) que trabaja en modo auto-aspiración a un flujo de  $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (ESI Scientific, Omaha, NE, Estados Unidos) o bien a  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (Savillex, AHF Analysentechnik, Tübingen, Alemania) y una cámara de nebulización combinada (ciclónica/doble paso) de cuarzo. Alternativamente, en este equipo también se usó un nebulizador de PFA de flujo cruzado de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (Savillex, AHF Analysentechnik, Tübingen, Alemania), trabajando en modo auto-aspiración y montado en una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott de cuarzo.

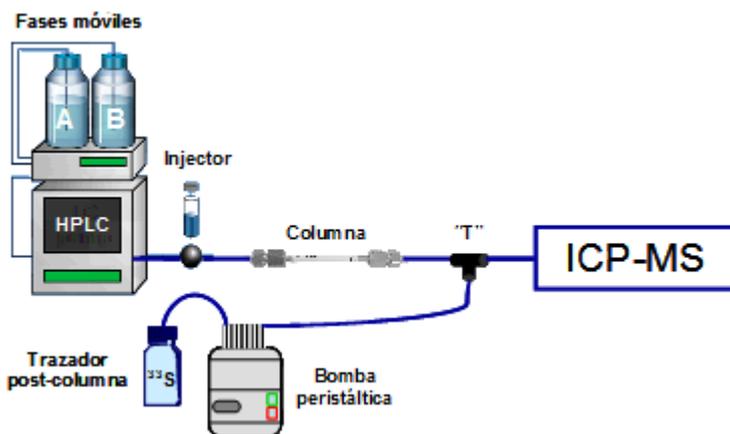
Tal como se comentará con más detalle posteriormente, el equipo posee 9 detectores de copas de Faraday. Como novedad frente a otros equipos similares, el Neptune Plus también posee 3 detectores SEM para la determinación de relaciones isotópicas de elementos a muy bajas concentraciones.

#### **3.1.2- Instrumentación utilizada para las separaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

En las separaciones HPLC post-columna (Figura 15) se utilizó la siguiente instrumentación:

- Equipo de HPLC compuesto por un sistema de bomba de alta presión Surveyor LC Pump Plus (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania) y una válvula de inyección de seis vías, modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA) con bucles de inyección intercambiables de PEEK (polyether ether ketone) de 20, 50 y 100  $\mu\text{L}$  de capacidad.

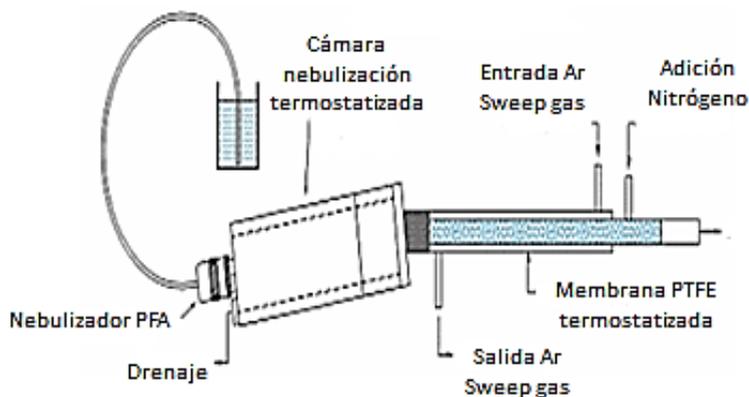
- Sistema post-columna compuesto por una bomba peristáltica Miniplus 3 (Scharlab, Barcelona, Spain) y una pieza T para para la adición continua del isótopo enriquecido a la salida del sistema cromatográfico.
- Columna de HPLC de fase inversa Discovery BIO Wide Pore C18 (15 cm X 2,1 mm, 5  $\mu$ m tamaño partícula (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- Columna de HPLC de fase inversa Mediterranea Sea18 (15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula (Teknokroma, Barcelona, España).
- Columna de intercambio catiónico Dionex Ionpac CS12A con una precolumna CG12 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania).



**Figura 15.** Esquema separación HPLC post-columna

### **3.1.3- Sistema de desolvatación acoplado a los equipos ICP-MS**

El sistema de desolvatación acoplado a los equipos ICP-MS fue un Aridus II (CETAC Technologies Inc., Nebraska, USA). Un esquema del equipo de desolvatación Aridus II aparece en la Figura 16. El flujo de Argón (sweep gas) fue optimizado en cada sesión de medida para obtener la señal óptima en los equipos ICP-MS. Sin embargo, para nuestro fin, el gas nitrógeno no fue empleado en ninguno de nuestros experimentos ya que disminuía notablemente la señal de iones que llegaban al detector. Para la optimización del Argón se utilizaba una disolución equimolar de los 3 isótopos de azufre.



**Figura 16.** Esquema del equipo de desolvatación Aridus II (obtenido de la página web del fabricante)

La disolución se introduce en el nebulizador de PFA a un flujo de 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  mediante autoaspiración. La cámara de nebulización está termostata a 110 °C, para reducir la formación de gotas de disolvente dentro de la misma. Adicionalmente, la cámara de nebulización posee un sistema de drenaje. El gas nebulizador (argón) transporta el aerosol hacia una membrana tubular microporosa de PTFE calentada a 160 °C. El vapor del disolvente pasa a través de la membrana y es eliminado por un flujo externo de Ar ("sweep gas"), mientras que los analitos continúan por el interior del tubo hacia el ICP-MS.

### **3.1.4- Otra instrumentación**

- Balanza analítica AB 104 (Mettler Toledo, Barcelona, España) con una resolución de 0,1 mg.
- Horno de microondas modelo Ethos I de Milestone (Sorisole, Italia) equipado con un rotor para diez bombas de teflón de media presión y sensor de temperatura.
- Para el ajuste del pH se empleó un pH-metro modelo Basic 20 de Crison (España).
- Microcentrífuga MiniSpin Plus de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania) y centrífuga Biofuge Stratos modelo Heraeus (Hanau, Alemania).
- Agitador mecánico a vibración Vortex modelo classic (VELP Scientifica, Usmate, Italia).
- Concentrador centrífugo de Eppendorf (SpeedVac Vacufuge concentrator, San Diego, USA).

### 3- Experimental

---

- Baño de agua termostatzado de control digital modelo Digiterm 100 (JP Selecta, Barcelona, España).
- Sistema cromatográfico HPCL Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con un colector de fracciones y un detector de longitud de onda variable.
- Columna cromatográfica de HPLC preparativa de fase reversa Zorbax Eclipse XDB (9,4x250 mm, 5µm tamaño partícula) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
- Cromatografo de gases Agilent 7890 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) operando a 70 eV. El GC poseía un inyector Split/splitless y una columna capilar DB-5 MS (5% fenil-metil siloxano, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm).
- Termomezclador compacto (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) utilizado para la hidrólisis enzimática y la derivatización de la metionina.
- Centrífuga 5810R D de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- Para eliminar el disolvente de las disoluciones se utilizó un evaporador de vacío centrífuga (Genevac, Suffolk, UK).

### **3.2- Materiales y reactivos**

- Agua ultrapura con un contenido orgánico total (TOC) inferior a 5 ng·g<sup>-1</sup>, filtrada (0,22 µm) y desionizada (18 MΩ·cm) obtenida a través de un sistema de purificación Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Molsheim, Francia).

- Las disoluciones patrón de azufre de abundancia natural, se obtuvieron por dilución de una disolución patrón certificada de 1000 mg·L<sup>-1</sup> de azufre, como ácido sulfúrico en agua, suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania).
- Los isótopos estables enriquecidos empleados, azufre-33 (99,92%) y azufre-34 (99,50%), fueron proporcionados por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).
- Ácido nítrico y ácido clorhídrico ultrapuros obtenidos mediante destilación lenta “sub-boiling” de ácido nítrico concentrado al 65% (p/v) y ácido clorhídrico concentrado al 37% (p/v) respectivamente, de calidad pro-análisis (Merck).
- Los patrones de azufre de alta pureza utilizados en la cromatografía fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza) y Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA): metionina, cisteína, homocisteína, homocistina, taurina, cisteinín-glicina oxidada, glutatión, sulfato de sodio, tiosulfato de sodio y tiocianato de sodio.
- El patrón péptido inhibidor BAX V-5 fue suministrado por Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Los reactivos para la síntesis de levadura se obtuvieron de Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) y Fluka (Buchs, Suiza): glucosa (>99.5% de pureza); Aminoácidos (>99% de pureza): histidina, triptófano, leucina, arginina, lisina, treonina, valina, isoleucina, serina, ac. glutámico, fenilalanina, prolina, uracilo, adenina; Vitaminas: biotina (vit. B7), ácido fólico (vit. B9), pantotenato cálcico (vit. B5), niacina (vit. B3), hidrocloreuro de piridoxina (vit. B6), hidrocloreuro de tiamina (vit. B1), ácido *p*-aminobenzoico (vit. BX), riboflavina (vit. B2), inositol (vit. B8); Compuestos suministradores de elementos esenciales: ácido

### 3- Experimental

---

bórico, yoduro de potasio, cloruro férrico, molibdato de sodio, cloruro de manganeso, cloruro de zinc, nitrato de cobre; Sales inorgánicas: fosfato de monopotasio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio.

- Los reactivos para la preparación del medio YPD se obtuvieron de Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA): peptona, extracto de levadura, agar y glucosa.
- Proteasa XIV obtenida de Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Los reactivos necesarios para la simulación de la digestión gastrointestinal de la levadura enriquecida fueron obtenidos de Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA): Pepsina (de estómago porcino), pancreatina (de páncreas porcino), amilasa, sales biliares, bicarbonato de sodio y cloruro de sodio.
- Los reactivos derivatizantes clorhidrato de metoxyamina (98%), N-tert-butildimetilsili-N-metiltrifluoroacetamida con 1% tert-butildimetilclorosilano ( $\geq 95\%$ ) y piridina ( $\geq 98\%$ ) fueron suministrados por Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Acetato de amonio obtenido de Fluka Analytical (Buchs, Suiza).
- Tris(hidroximetil)aminometano suministrado por Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Metanol de calidad HPLC suministrado por Merck.
- Hidróxido de tetrabutilamonio e hidróxido de tetrametilamonio obtenidos de Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético suministrado por Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- Isoflurano (Abbott Laboratories, Illinois, Chicago, USA).
- Gas argón de 99,999% de pureza suministrado por Air Liquide (Madrid, España).

- Se han utilizado filtros de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore, Bedford, MA, USA) de un solo uso, y jeringas de 1 y 5 mL BD Plastipak<sup>TM</sup> (Becton, Dickinson and Company, España).
- Tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga de PP (polipropileno) (Deltalab, Llanera, España).
- Vasos de precipitados de PTFE (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Tubos eppendor (1.5 mL) (Labbox, Mataró, España).



# 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$



## **4.1- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$**

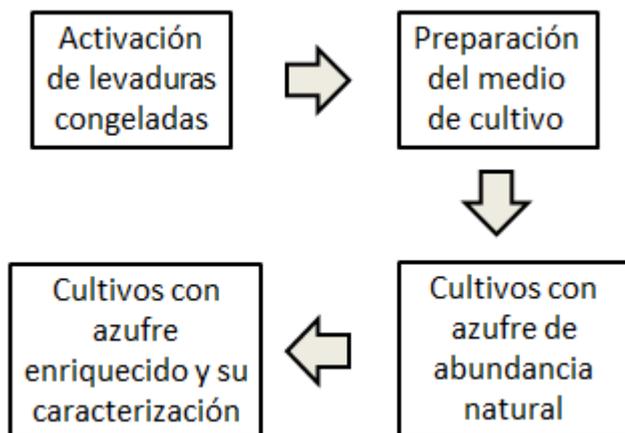
### **Saccharomyces cerevisiae**

La levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C.Hansen) es un hongo unicelular utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino. Como se ha comentado previamente, la *S. cerevisiae* se viene utilizando en varios campos científicos con distintos fines. Es un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria pero que comparte con ella muchas de sus ventajas técnicas. Además de su rápido crecimiento, la dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con mínimas precauciones.

En nuestro laboratorio, en colaboración con el grupo del profesor Fernando Moreno, se ha venido utilizando la *S. cerevisiae* para la síntesis de compuestos enriquecidos en selenio y azufre [88,96], cultivando las células de levadura en un medio en el que se había eliminado o reducido drásticamente el selenio o el azufre natural y al que se había añadido selenio o azufre enriquecidos en los isótopos 77 y 34 respectivamente.

En nuestro caso para alcanzar el objetivo final de evaluar el enriquecimiento isotópico de azufre en orina de animales de laboratorio tras administrarles una dosis de levadura enriquecida, necesitábamos disponer de un stock abundante de levadura enriquecida por cuanto se pretendía realizar este estudio a lo largo de varias semanas con varios individuos. Además, se pretendía también modificar y optimizar algunos aspectos de la metodología puesta a

punto anteriormente con el fin de conseguir una levadura con un mayor enriquecimiento isotópico.



**Figura 17.** Esquema del trabajo con levaduras

El proceso llevado a cabo se encuentra esquematizado en la Figura 17. En primer lugar se activaron las levaduras congeladas que se encontraban almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para ello se utilizó un medio YPED (*yeast extract peptone dextrose*) y se obtuvo un stock de levadura fresca. Después se preparó el medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras utilizando reactivos exentos de azufre de abundancia natural. Antes de comenzar los cultivos con el isótopo marcado se realizaron unos cultivos con azufre de abundancia natural para comprobar el correcto funcional del proceso. Posteriormente, se realizaron los cultivos con azufre  $^{34}\text{S}$  para obtener la levadura marcada.

### 1- Activación de las levaduras congeladas

Se procedió, en primer lugar, a activar las levaduras que estaban congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en glicerol. Para ello se preparó un medio YEPD, abreviado YPD, que contenía:

- 2% Peptona
- 1% Extracto de levadura que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento
- 2% Agar
- 1% Dextrosa o glucosa

Se añadió agua hasta 1L (Figura 18) y se esterilizó en el autoclave ( $140^{\circ}\text{C}$ , 2.5 atm., 15 min).



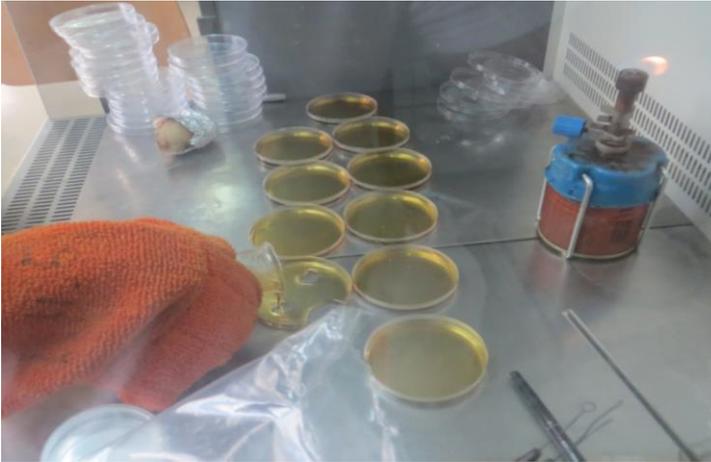
**Figura 18.** Medio YPD para la activación de las levaduras

Una vez esterilizado, el medio de crecimiento YPD se colocó en placas petry (Figura 19). Se dejó enfriar y cuando se solidificó (30 min) se colocaron las tapas y se pusieron boca abajo (se colocaron así para

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

evitar que las gotas de condensación caiga sobre los medios de cultivo). Se metieron en la cámara a 5°C durante 2 horas para que acabasen de solidificar.



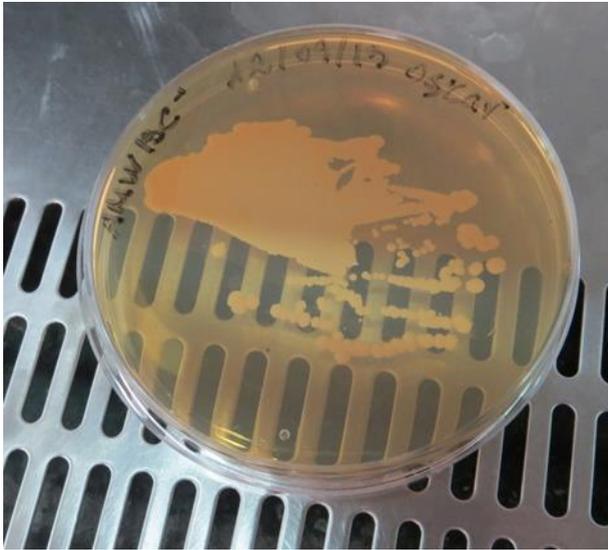
**Figura 19.** Medio YPD distribuido en placas petry

A continuación, se inocularon 50  $\mu\text{L}$  de levadura AMW-13C en el medio sólido (placa petry) con el asa de siembra (en la campana de extracción y con el mechero encendido) como se puede observar en la Figura 20.



**Figura 20.** Inoculación de levaduras con asa de siembra en medio sólido

Después se introdujeron en la estufa calefactora a 28°C durante 24 horas. Durante este tiempo las levaduras crecieron en las placas de cultivo y de esta forma se consiguió disponer de stock de levadura fresca (Figura 21).



**Figura 21.** Levaduras transcurridas 24 horas en la estufa a 28°C

Por otro lado se preparó un medio YPD líquido que no contenía agar. Se inocularon 50  $\mu\text{L}$  de levadura AMW-13C y se introdujo en la cámara termostatzada a 28°C con agitación. Transcurridas las 24 horas se centrifugó el medio de cultivo para recoger las levaduras y se almacenaron a -80°C en glicerol para tener un stock congelado para el futuro.

## 2- Preparación del medio de cultivo para el crecimiento de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En primer lugar se prepararon todos los nutrientes necesarios para que las levaduras pudieran crecer en el medio de cultivo. Se hicieron disoluciones concentradas de cada reactivo para luego añadir la cantidad necesaria en función del volumen del medio de cultivo. Cada reactivo se almacenó en las condiciones adecuadas para asegurar su estabilidad con el tiempo (temperatura ambiente o refrigeración). En el caso de la glucosa y el cloruro de amonio no se hicieron disoluciones concentradas si no que se disolvieron las cantidades necesarias para cada cultivo en el mínimo volumen posible de agua Mili-Q durante la preparación del mismo.

El medio de cultivo seleccionado fue un medio sintético que contenía todos los compuestos necesarios para el crecimiento de las levaduras pero evitando incorporar reactivos con azufre de abundancia natural. Para ello se sustituyeron los compuestos que presentan azufre en su composición, típicamente sulfatos inorgánicos, por otras sales inorgánicas como cloruros o nitratos.

En la Tabla 4 se recogen los nutrientes utilizados, agrupados por familias, y la cantidad por litro de cultivo necesario de cada uno de ellos. Entre corchetes se indican las sustancias que han sido cambiadas respecto al medio convencional para eliminar las fuentes de azufre natural.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en <sup>34</sup>S

Nutrientes	Cantidades
<b>FUENTE DE CARBONO</b>	
Glucosa	30 g
<b>FUENTE DE NITRÓGENO</b>	
Cloruro de amonio [sulfato de amonio]	5 g
<b>AMINOÁCIDOS Y BASES NITROGENADAS</b>	
Histidina (His) <sup>a</sup>	75 mg
Triptófano (Trp) <sup>a</sup>	75 mg
Leucina (Leu) <sup>a</sup>	75 mg
Arginina (Arg) <sup>a</sup>	75 mg
Lisina (Lys) <sup>a</sup>	75mg
Treonina (Thr) <sup>c</sup>	75 mg
Valina (Val) <sup>a</sup>	75 mg
Tirosina <sup>a</sup>	75 mg
Isoleucina (Ile) <sup>a</sup>	75 mg
Serina <sup>a</sup>	75 mg
Ac Glutámico <sup>b</sup>	75 mg
Fenilalanina (Phe) <sup>b</sup>	75 mg
Prolina (Pro) <sup>a</sup>	75 mg
Uracilo <sup>b</sup>	75 mg
Adenina <sup>b</sup>	75 mg
<b>VITAMINAS</b>	
Biotina (vit. B7)	2 µg
Ácido fólico (vit. B9)	400 µg
Pantotenato cálcico (vit. B5)	2 µg
Niacina (vit. B3)	2 mg
Hidrocloruro de piridoxina (vit. B6)	400 µg
Hidrocloruro de tiamina (vit. B1)	200 µg
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (vit. B10)	400 µg

Riboflavina (vit. B2)	200 $\mu\text{g}$
Inositol (vit. B8)	400 $\mu\text{g}$
<b>COMPUESTOS SUMINISTRADORES DE ELEMENTOS ESENCIALES</b>	
Ácido bórico	500 $\mu\text{g}$
Yoduro de potasio	40 $\mu\text{g}$
Cloruro férrico	100 $\mu\text{g}$
Molibdato de sodio	200 $\mu\text{g}$
Cloruro de manganeso [sulfato de manganeso]	400 $\mu\text{g}$
Cloruro de zinc [sulfato de zinc]	200 $\mu\text{g}$
Nitrato de cobre [sulfato de cobre]	400 $\mu\text{g}$
<b>SALES INORGÁNICAS</b>	
Fosfato de monopotasio	1 g
Cloruro de magnesio [sulfato de magnesio]	0,5 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Cloruro de calcio	0,1 g
<b>FUENTE DE AZUFRE</b>	
Sulfato de amonio (natural o enriquecido)	100 g

**Tabla 4.** Composición del medio de cultivo (por litro)

Los aminoácidos fueron tratados de la siguiente manera para preservarlos hasta ser añadidos a los cultivos:

- Los señalados como (a) se conservaron refrigerados a 5°C.
- Los señalados como (b) se conservaron a temperatura ambiente.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

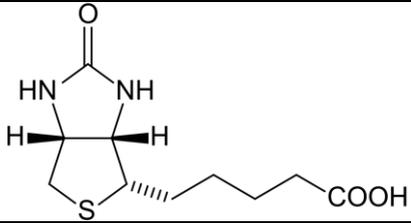
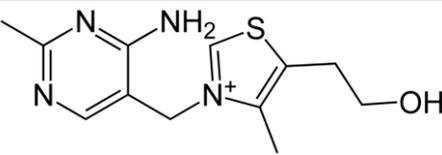
- Los señalados como (c) son inestables a la esterilización por autoclave por lo que se añadieron al medio de cultivo una vez que éste había sido esterilizado.

La tirosina y el ácido aspártico no son muy solubles en agua por lo que no se añadieron al medio de cultivo.

Es muy importante esterilizar estas disoluciones para evitar la contaminación por bacterias, hongos u otros microorganismos que luego puedan crecer en el medio de cultivo. Para ello las disoluciones se esterilizaban en el autoclave (140°C, 2.5 atm., 15 min) antes de preparar un medio de cultivo. Las disoluciones de aminoácidos inestables a la esterilización por autoclave se esterilizaban haciendo pasar la disolución a través de filtros de Nylon de 0.45 micra, operación que se realiza dentro de la campana extractora con el mechero bunchen encendido.

Con respecto a los estudios anteriores se realizaron pequeñas modificaciones en la composición del medio. Se añadieron mayor cantidad de aminoácidos, en concreto serina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina y prolina. Así, la cantidad total de aminoácidos se aumentó hasta 75 mg/L. También, a diferencia de trabajos anteriores, se adicionaron las bases nitrogenadas uracilo y adenina.

Desafortunadamente, no se han podido eliminar todas las fuentes de azufre de abundancia natural del medio de cultivo. En concreto, los compuestos biotina e hidrocloreuro de tiamina contienen átomos de azufre en su estructura (Tabla 5). A esto hay que añadir el azufre natural que contienen las propias células de levadura que se inoculan inicialmente en el cultivo.

Compuesto	Estructura
Biotina (vit. B7)	
Hidrocloruro de tiamina (vit. B1)	

**Tabla 5.** *Compuestos del medio de cultivo que contienen azufre en su estructura*

### 3- Cultivos con azufre de abundancia natural

Antes de realizar los cultivos de levaduras con azufre  $^{34}\text{S}$ , se llevó a cabo una primera prueba con azufre de abundancia natural para comprobar que tanto los nutrientes preparados como las levaduras estaban en buenas condiciones. Para comprobar que el crecimiento era el adecuado se hizo un seguimiento de la densidad óptica de los cultivos.

El proceso para el crecimiento de las levaduras en el medio de cultivo se detalla a continuación:

- 1) Mezcla de las cantidades adecuadas de (ver tabla 4):
  - Glucosa
  - Cloruro de amonio
  - Compuestos suministradores de elementos esenciales
  - Sales inorgánicas

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

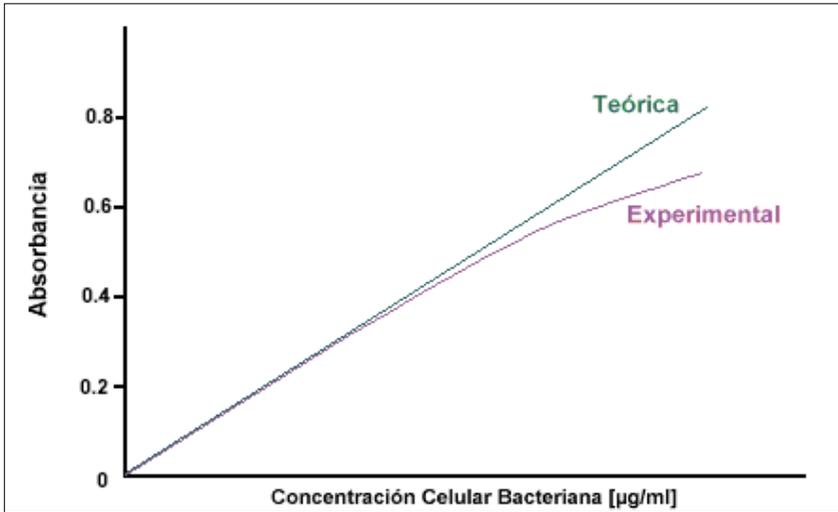
- Agua
- 2) Introducción de la mezcla en el autoclave para su esterilización.
- 3) Adición en la campana con mechero bunchen encendido para evitar contaminaciones de las cantidades adecuadas de (ver Tabla 4):
  - Aminoácidos
  - Vitaminas
- 4) Inoculación de las levaduras desde la placa petry (donde habían estado creciendo en estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas) con el asa de siembra dentro de la campana con mechero bunchen encendido.
- 5) Introducción en la cámara termostatzada a  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación constante (Figura 22).



**Figura 22.** Crecimiento levaduras en cámara termostatzada y con agitación

Durante el crecimiento se fueron tomando alícuotas del medio de cultivo para medir con un espectrofotómetro la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. En una suspensión microbiana la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la turbiedad o densidad óptica. La metodología es útil con suspensiones de densidad microbiana baja y con cultivos en donde los microorganismos son unicelulares y con un tamaño de unos cuantos micrómetros, características que les permiten mantenerse en suspensión y homogéneamente distribuidos.

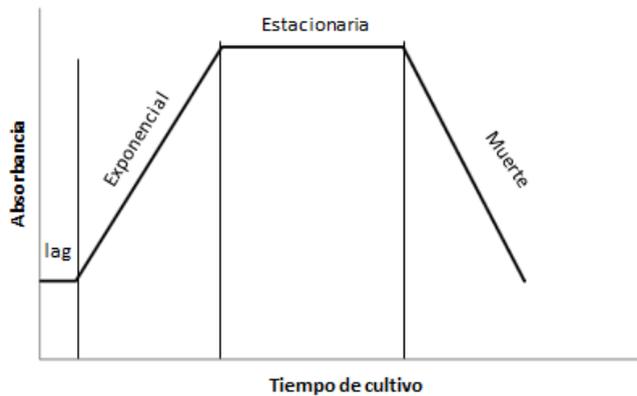
Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC (Unidad Formadora de Colonia) cuando los tamaños de las células bacterianas son diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar absorbancia (densidad óptica) con el número de microorganismos totales o con UFC (Figura 23).



**Figura 23.** Relación entre absorbancia y concentración celular

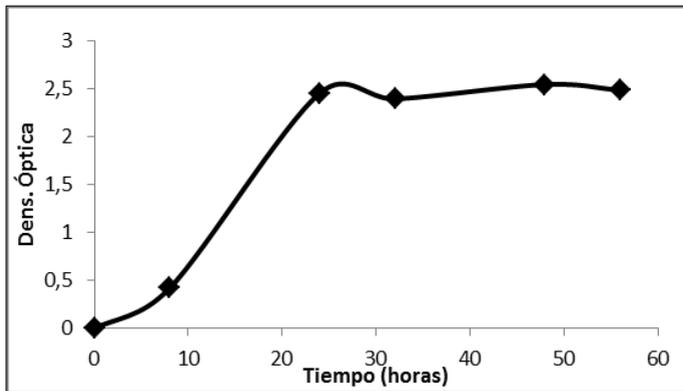
En el caso de las levaduras, una absorbancia de 0.1 equivale a  $1 \times 10^8$  células/ml aproximadamente.

La gráfica de crecimiento teórica esperada de las levaduras debería ser la siguiente:



**Figura 24.** Gráfica teórica del crecimiento de levaduras

En el estudio del crecimiento realizado para nuestros cultivos de levaduras se obtuvo la siguiente gráfica que aparece en la Figura 25:



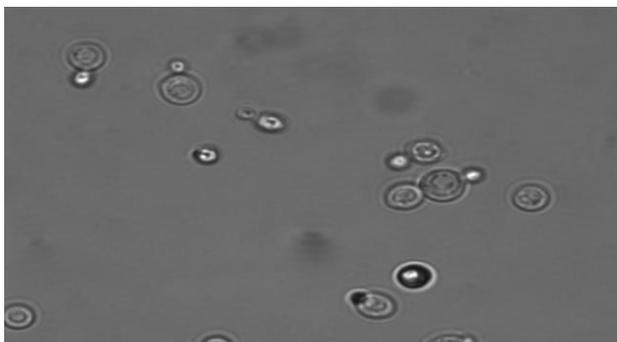
**Figura 25.** Gráfica experimental del crecimiento de levaduras

A las 24 horas se alcanzaba la fase estacionaria en donde no aumentaba la población de levaduras. Se decidió dejar para los siguientes medios de cultivo 36 horas como valor óptimo.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

Para asegurarnos de que no había ningún tipo de contaminación en los cultivos, se tomó una alícuota a las 24 horas y se midió en el microscopio. Se vio que las células eran levaduras dividiéndose y no se apreció otro tipo de células (Figura 26).

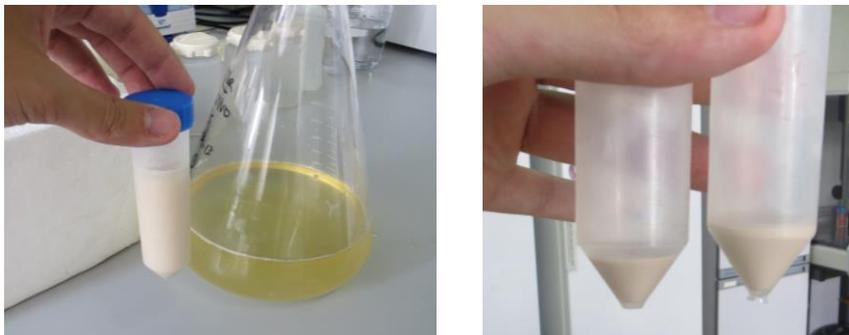


**Figura 26.** Muestra de cultivo bajo el microscopio

Una vez transcurridas las 36 horas de crecimiento se procedió a recoger las levaduras del medio de cultivo. Para ello se siguió este proceso:

- 1) Centrifugación de los medios de cultivo a 4.000 rpm durante 30 min.
- 2) Recogida de las levaduras por decantación y trasvase de las mismas a un tubo tipo Falcon de 50 mL utilizando agua estéril para arrastrar los posibles restos (Figura 27)
- 3) Nueva centrifugación a 4.000 rpm durante 2 min eliminando el sobrenadante por decantación.

Las levaduras obtenidas de este modo estaban listas para almacenar a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.



**Figura 27.** Recogida de levaduras tras 36 horas de crecimiento

Tras conseguir el crecimiento de las levaduras en un medio de cultivo de 300 mL se realizó otro segundo experimento aumentando la capacidad del medio hasta 1L. En los experimentos con azufre 34 se quería conseguir una gran cantidad de stock de levadura enriquecida para los futuros ensayos con animales, por lo que los medios de cultivo debían ser del mayor volumen posible para obtener así mayor cantidad de levaduras por cultivo realizado. Con el cultivo de 1L de capacidad se obtuvieron alrededor de 8 gramos de levadura por litro de cultivo.

#### 4- Cultivos de levaduras con azufre enriquecido y su caracterización

Una vez comprobado el crecimiento de las levaduras con nuestro medio de cultivo, se repitió el proceso utilizando sulfato de amonio marcado en azufre 34 como fuente del azufre enriquecido.

Las levaduras se caracterizaron mediante dilución isotópica para conocer el enriquecimiento obtenido en azufre 34 y la cantidad de

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

azufre incorporado desde el medio de cultivo. En primer lugar se digirieron 100 mg de levadura con 8 mL de ácido nítrico sub-boiling en un microondas Milestone Ethos One.

El programa de digestión utilizado se muestra en la Tabla 6:

Tiempo (min)	Potencia (W)	Temp (°C)
3	700	100
10	800	165
5	800	190
15	800	190

**Tabla 6.** Programa de digestión

Con este procedimiento, se consiguió la disolución completa de las levaduras, la caracterización se realizó mediante dilución isotópica utilizando azufre 33 como trazador. Para ello se mezcló la disolución obtenida tras la digestión (diluida 1:20) con una disolución de  $^{33}\text{S}$  de 500 ppb en una proporción 1:1 y se llevó al equipo ICP-MS de doble enfoque utilizando las condiciones de medida que figuran en la Tabla 7. Para el cálculo de la concentración total de azufre se utilizó la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 7).

Parámetros	DF-ICP-MS
Potencia Rf	1350 W
Flujo gas plasmógeno	14 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas auxiliar	0,95 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas nebulizador	0,91L min <sup>-1</sup> Ar
Resolución	3000
Método de adquisición	5 runs, 200 passes, 0,01 s tiempo medida, 10 muestras por pico, 3 s tiempo medida
Modo detección	Conteo
Isótopos medidos	$^{32}\text{S}$ , $^{33}\text{S}$ , $^{34}\text{S}$

**Tabla 7.** Condiciones de medida en el equipo DF-ICP-MS

Los resultados de la caracterización de los diferentes cultivos de levadura se muestran en la Tabla 8.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

Fecha síntesis	Volumen del cultivo (L)	Cantidad de levadura obtenida (g)	Abund. $^{34}\text{S}$	Conc. S ( $\mu\text{g/g}$ )
19/09/2013	1	8,3	91,02 $\pm$ 0,24	415 $\pm$ 10
	1	9,1	92,00 $\pm$ 0,24	458 $\pm$ 10
	2	15,6	93,13 $\pm$ 0,25	471 $\pm$ 2
2/10/2013	2	14,6	93,14 $\pm$ 0,22	412 $\pm$ 14
	2	13,6	93,11 $\pm$ 0,22	485 $\pm$ 9
23/10/2013	2	15,4	93,98 $\pm$ 0,55	343 $\pm$ 7
25/10/2013	2	16,2	93,3 $\pm$ 0,99	289 $\pm$ 5
30/10/2013	2	14,3	92,28 $\pm$ 0,49	341 $\pm$ 8
01/11/2013	2	14,8	92,81 $\pm$ 0,48	327 $\pm$ 6
06/11/2013	2	15,3	91,71 $\pm$ 0,48	323 $\pm$ 13
08/11/2013	2	15,6	93,34 $\pm$ 0,59	300 $\pm$ 7
13/11/2013	2	13,1	92,39 $\pm$ 0,43	334 $\pm$ 5
15/11/2013	2	14,9	92,92 $\pm$ 0,45	331 $\pm$ 6

**Tabla 8.** Caracterización de cultivos de levadura enriquecida

En todos los casos obtuvimos un enriquecimiento superior al 91% en azufre  $^{34}\text{S}$ .

Estas levaduras se utilizaron en los experimentos posteriores con animales de laboratorio, y, como se describe a continuación, para la obtención de un patrón de metionina enriquecido en azufre  $^{34}\text{S}$  y su posterior aplicación en la cuantificación del compuesto en muestras de interés clínico.

## **4.2- Extracción y preconcentración de metionina enriquecida en $^{34}\text{S}$**

La metionina enriquecida en azufre  $^{34}\text{S}$  fue extraída y preconcentrada a partir de la levadura previamente sintetizada también enriquecida en este isótopo de azufre.

Para ello, se ensayaron diferentes medios de extracción. En concreto, se probaron las extracciones ácidas con HCl y con proteasas. En los dos casos, tras el tratamiento con el reactivo extractante, se centrifugaba a alta velocidad (14.000 r.p.m) para poder separar el sobrenadante.

Para comprobar si la metionina había sido extraída y separarla de otros compuestos de azufre se utilizó una cromatografía de fase reversa (C18) con fase móvil de acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y 2% metanol en régimen isocrático (flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$  y volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ ) utilizando indistintamente como sistema de detección MC-ICP-MS o DF-ICP-MS. Las condiciones experimentales de medida aparecen en la Tabla 9.

4- Síntesis de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$

Parámetros	MC-ICP-MS	DF-ICP-MS
Potencia Rf	1200W	1350 W
Flujo gas plasmógeno	14 L min <sup>-1</sup> Ar	14 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas auxiliar	0,9 L min <sup>-1</sup> Ar	0,95 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas nebulizador	0,89 L min <sup>-1</sup> Ar	0,91L min <sup>-1</sup> Ar
Resolución	Medium (~3000)	3000
Método de adquisición	2 bloques, 980 ciclos, 4,194 s integration time, 3 s tiempo medida	2.200 “runs”, 1 “passes”, 0,01 s tiempo medida, 14 muestras por pico, 3 s tiempo medida
Modo detección	Estático	Conteo
Isótopos medidos	$^{32}\text{S}$ , $^{33}\text{S}$ , $^{34}\text{S}$	$^{32}\text{S}$ , $^{33}\text{S}$ , $^{34}\text{S}$
Configuración copas de Faraday	L4 $^{32}\text{S}$ C $^{33}\text{S}$ H4 $^{34}\text{S}$	

**Tabla 9.** Condiciones de medida equipo en el DF-ICP-MS y en el MC-ICP-MS

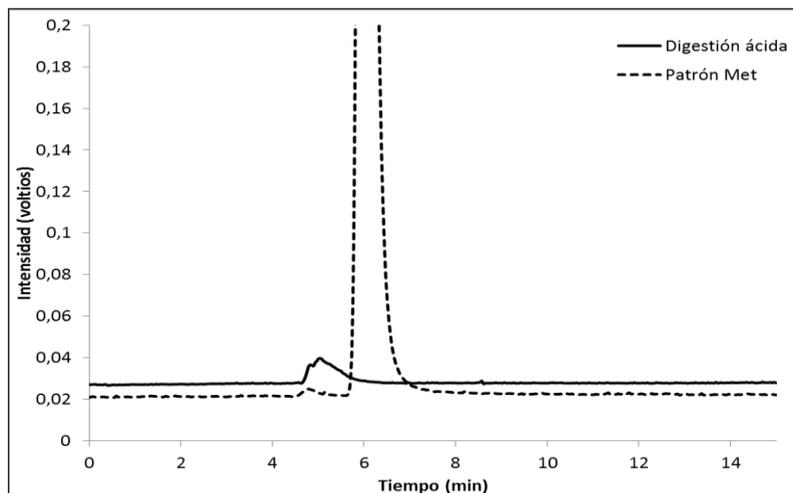
### **4.2.1- Extracción con HCl 6M**

Se ensayaron dos medios ácidos [193,194] para extraer la metionina:

- HCl 6M a 110°C durante 24 horas. Esta reacción se utilizó con y sin la adición de fenol.
- HCl 6M con sonicación durante 10 minutos. En esta ocasión también se realizó con y sin fenol.

Se utilizaron 0.02 g de levadura y 2 mL de HCl 6M, añadiendo 40 µg de fenol en los casos en los que este reactivo fue utilizado. El ácido clorhídrico debería romper los enlaces peptídicos, mientras que el fenol se añade como reactivo protector para evitar la oxidación de la metionina durante el proceso.

En ninguno de los dos casos se consiguió extraer la metionina que contenía la levadura. Como se muestra en la Figura 28, el pico que correspondería a la metionina no se encontraba en el extracto de la digestión ácida. Este resultado concuerda con algunos de los trabajos publicados en los que se describen bajos porcentajes en la extracción de la metionina y selenometionina en levaduras utilizando HCl.



**Figura 28.** Cromatograma de extracción ácida de levadura con detección MC-ICP-MS (muestra de levadura y patrón natural de 5 ppm)

### **4.2.2- Extracción enzimática con proteasa**

Se decidió utilizar la proteasa XIV como reactivo extractante basándonos en experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio con selenocompuestos [195]. Esta proteasa actúa de manera genérica rompiendo los enlaces peptídicos sin especificidad. El medio de reacción fue Tris-HCl 0,1 M a pH 7,5 y se dejó reaccionar durante 24 horas a 37°C.

Antes de realizar la extracción enzimática se realizó una rotura mecánica de las células de la levadura para favorecer la ruptura de los enlaces peptídicos. Además, se probaron diferentes condiciones de

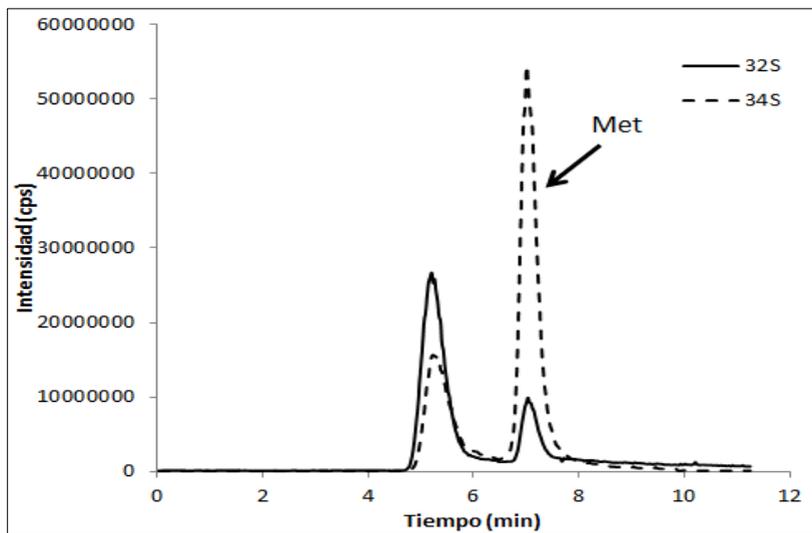
extracción variando la cantidad de proteasa para conseguir la mayor cantidad de metionina posible (Tabla 10). Para poder comparar la cantidad extraída en cada uno de los experimentos se comparó el área de la metionina enriquecida extraída con el área de un patrón de metionina natural de 5  $\mu\text{g/g}$ .

Experimento	Cant. Proteasa XIV (mg)	Relación áreas (Met $^{34}\text{S}$ /Met natural)
1	5	2,3
2	10	3,1
3	20	1,2
4	50	0,5

**Tabla 10.** Condiciones extracción metionina con proteasa XIV para 0,15 g de levadura

Como se puede apreciar en la Tabla 8, la cantidad óptima de proteasa fue de 10 mg en un medio en un medio de 0,7 mL Tris-HCl 0.1 M a pH 7,5.

El cromatograma obtenido en las condiciones óptimas se muestra en la Figura 29. Se puede apreciar el alto grado de enriquecimiento en azufre  $^{34}$  que posee la metionina extraída a partir de la levadura.



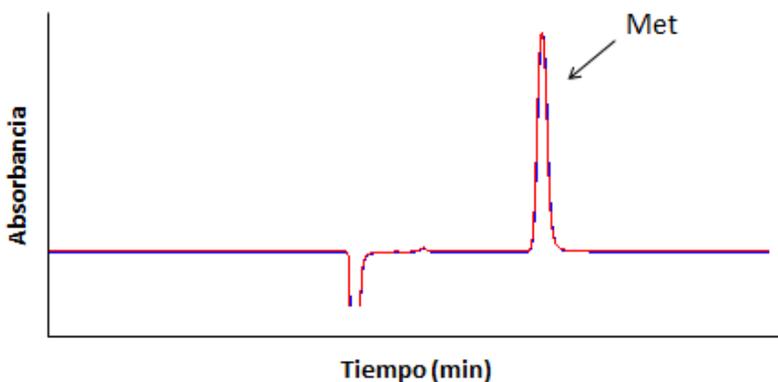
**Figura 29.** Cromatograma de extracción enzimática de levadura optimizada

Por tanto, el método de extracción que se utilizó para conseguir una disolución patrón de metionina enriquecida en azufre 34 a partir de la levadura fue la digestión enzimática con proteasa XIV de acuerdo a las condiciones optimizadas.

### **4.2.3- Aislamiento de la metionina $^{34}\text{S}$ mediante HPLC preparativa**

Para el aislamiento de la metionina se usó un sistema de HPLC preparativa con colector de fracciones. La cromatografía utilizada fue de fase reversa, con una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB (9.4x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y una fase móvil de acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y 2% metanol en régimen isocrático. Se utilizó un flujo de 1,5 mL/min y la cantidad de muestra inyectada en cada ocasión fue de 100  $\mu\text{L}$ . La detección de la metionina se realizó por UV-VIS midiendo a 210 nm.

En primer lugar se investigó el periodo de tiempo en el que eluía la metionina de esta columna cromatográfica utilizando un patrón de abundancia natural. El tiempo de elución fue entre 9-9,8 minutos, con un tiempo de retención (máximo del pico cromatográfico) de 9,2 min (Figura 30).

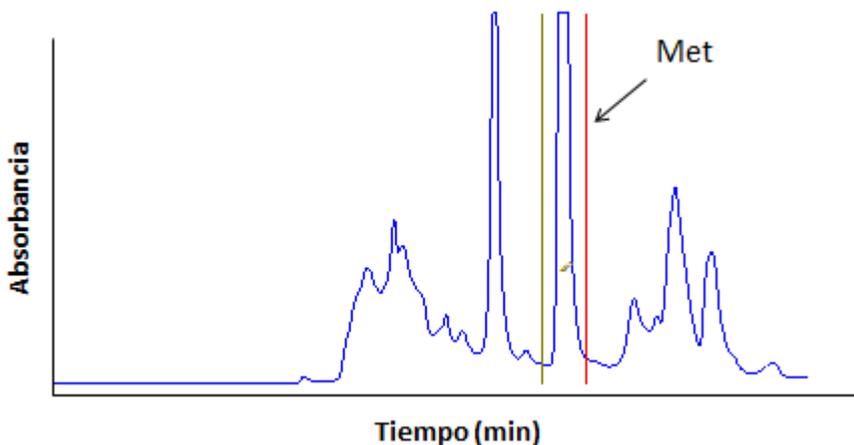


**Figura 30.** Cromatograma HPLC preparativa de patrón de metionina (detección UV-VIS)

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

A continuación se procedió a inyectar sucesivamente (20 veces) el extracto obtenido con proteasa XIV recogiendo en cada caso la fracción eluida entre 9-9,8 minutos (Figura 31).



**Figura 31.** Fracción recogida en muestra de levadura digerida (detección UV-VIS)

Todas las fracciones recogidas se juntaron y se llevaron a sequedad en un evaporador centrífuga que trabajaba a vacío. Después se reconstituyeron en una pequeña cantidad de agua mili-Q (hasta la completa redisolución). Para su conservación, esta disolución se introdujo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. Se prepararon de esta manera dos stocks de metionina enriquecida.

### **4.3- Caracterización de la Metionina enriquecida en $^{34}\text{S}$**

La caracterización en concentración y abundancia isotópica de las disoluciones patrón de metionina enriquecidas en  $^{34}\text{S}$  se llevó a cabo utilizando tanto medidas por MC-ICP-MS como GC-MS.

#### **4.3.1- Caracterización por MC-ICP-MS utilizando $^{33}\text{S}$ enriquecido**

Para la determinación de la concentración total de azufre y las abundancias isotópicas de las disoluciones patrón de metionina enriquecida se utilizó el análisis por dilución isotópica convencional con una disolución de azufre 33 como trazador y detección con equipo multicolector ICP-MS. La disolución de la metionina obtenida se diluyó 1:100 y se realizó una mezcla con una disolución patrón de  $^{33}\text{S}$  (1  $\mu\text{g/g}$ ) en una proporción 1:1. Posteriormente se midió la mezcla en el equipo MC-ICP-MS utilizando las condiciones de la Tabla 9. La concentración de metionina enriquecida se obtuvo utilizando la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 7).

Los resultados obtenidos para la concentración y el enriquecimiento en azufre 34 se presentan en la Tabla 11.

<b>Metionina <math>^{34}\text{S}</math></b>	<b>Concentración de S (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>% <math>^{34}\text{S}</math></b>
Stock 1	$170 \pm 4$	$81,2 \pm 0,5$
Stock 2	$401 \pm 5$	$79,5 \pm 0,5$

**Tabla 11.** Caracterización de metionina enriquecida por ICP-MS

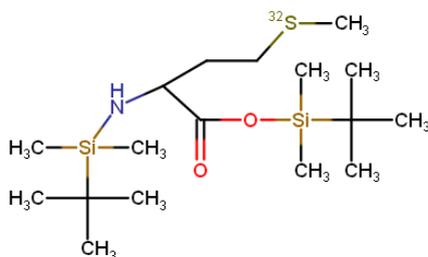
En el experimento del Stock 2 se utilizó mayor cantidad de levadura (5 g) para la extracción de la metionina enriquecida con respecto al experimento del stock 1 (1 g). De esta manera la concentración de metionina en este stock es superior, y sin embargo, a pesar de utilizar mayor cantidad de reactivos que pudiesen contener azufre de abundancia natural durante el proceso de extracción, se observó que el enriquecimiento en azufre  $^{34}\text{S}$  apenas disminuye.

### **4.3.2- Caracterización mediante GC-MS**

Para la caracterización de la metionina por GC-MS fue necesaria una reacción de derivatización previa para transformar la metionina en una especie volátil y térmicamente estable. Para ello, 200 $\mu\text{L}$  de la disolución patrón de metionina se llevó a sequedad y sobre el residuo sólido resultante se añadieron los siguientes reactivos:

1. 100 $\mu\text{L}$  de metoxiamina con 2% piridina con incubación durante 10 minutos a 40°C.
2. 150 $\mu\text{L}$  de MTBSTFA con un 1% TBDMCS e incubación durante 10 minutos a 60°C

Por medio de esta reacción la metionina se transforma en un derivado volátil del tert-butildimetilsilil (Figura 32).



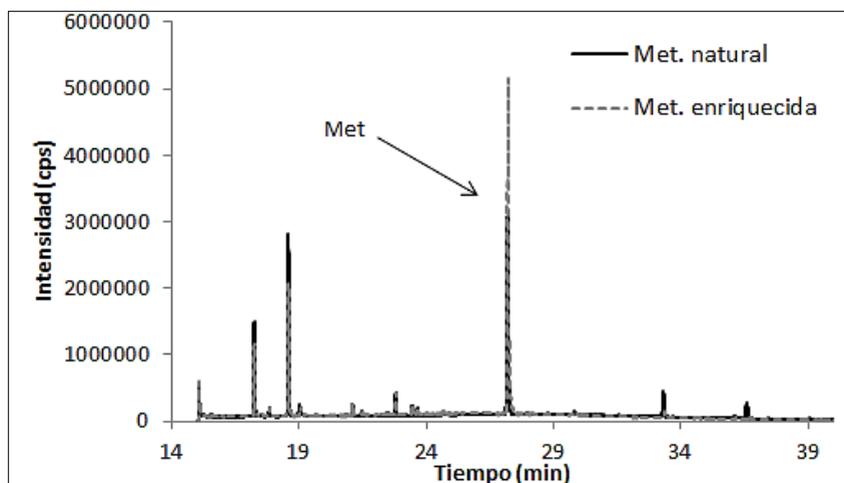
**Figura 32.** Estructura de metionina derivatizada

El sobrenadante se inyectó en el equipo de GC-MS utilizando las condiciones de la Tabla 12.

Parámetros	GC-MS
Potencia EI	70 eV
Flujo gas portador	2mL/min (Helio)
Modo inyección	<i>Splitless</i>
Volumen muestra inyectado	2 $\mu\text{L}$
Tiempo de purga	1 minuto
Programa de temperatura	Inicialmente se mantuvo a 60 °C durante 1 min, después se aplicó una rampa de 5°C/min hasta los 320 °C, y se mantuvo durante 10 min. El tiempo total 68 min.
Temperatura inyector	250°C
Temperatura interfase	280°C
Temperatura fuente de ionización	230°C
Modo de adquisición	SIM, 10 ms tiempo de residencia

**Tabla 12.** Condiciones de medida equipo en el GC-MS

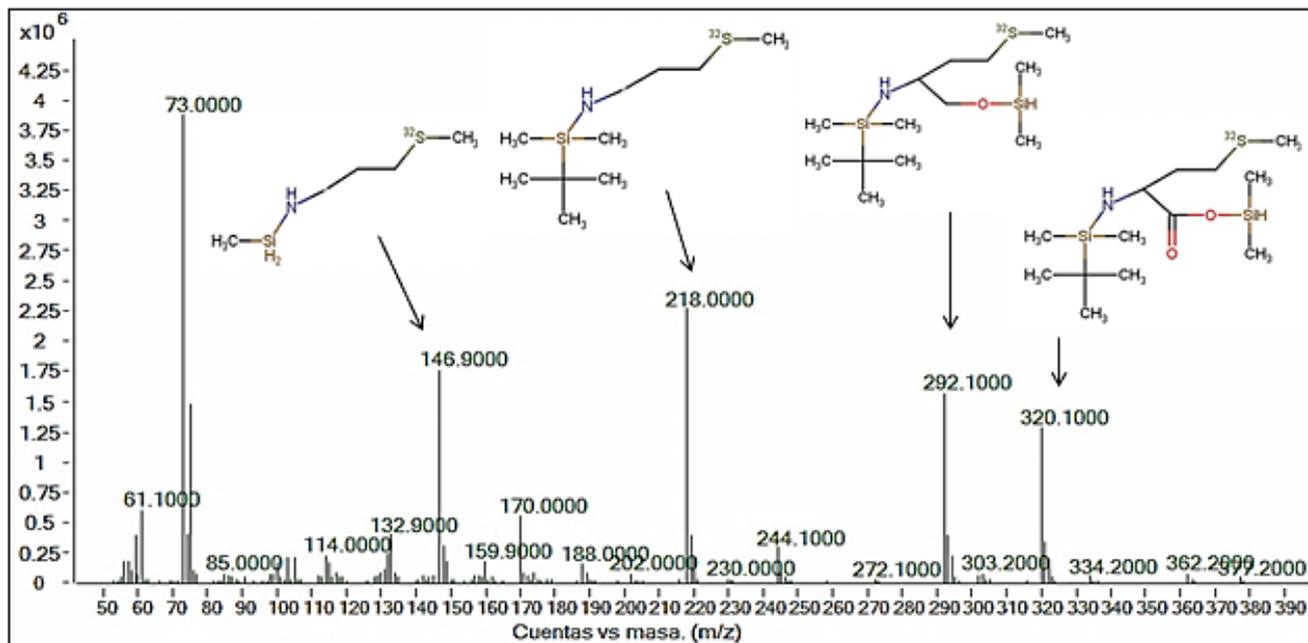
En primer lugar, se comprobó que el compuesto extraído y aislado de la levadura era realmente metionina. Para ello se comparó el cromatograma obtenido para el patrón enriquecido con el de un patrón de metionina de abundancia natural. En ambos casos se obtuvo el mismo cromatograma con varios picos procedentes del reactivo derivatizante y un pico de metionina sobre los 27 minutos (Figura 33).

**Figura 33.** Cromatograma GC-MS de metionina enriquecida y natural (metionina enriquecida diluida y patrón natural de 5 ppm).

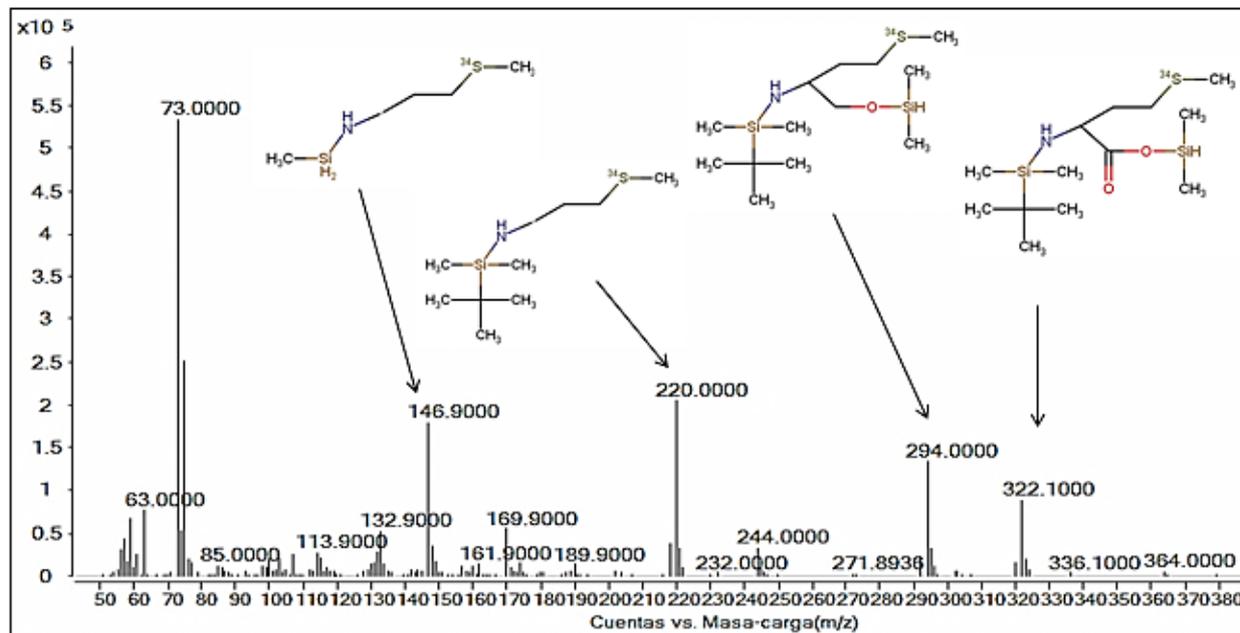
Los espectros de fragmentación para la metionina natural y enriquecida se muestran en las Figuras 34 y 35 respectivamente. Como se puede observar el ion molecular es claramente minoritario apareciendo fragmentos, en el caso de la metionina natural, a las masas 320, 292,

218, 147, si bien este último no contiene azufre. El pico correspondiente a la masa 73 procede del reactivo derivatizante.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$



**Figura 34.** Espectro de masas de metionina natural derivatizada



**Figura 35.** Espectro de masas de metionina enriquecida derivatizada

En el caso de la metionina enriquecida (Figura 35) se observó cómo los fragmentos 322, 294, y 220 se corresponden a los mismos fragmentos que en el caso anterior pero conteniendo el isótopo 34 en vez del 32 (diferencia de dos unidades de masa).

Una vez identificada la metionina, se procedió a su caracterización (enriquecimiento isotópico) utilizando el fragmento de  $m/z$  320. Para ello, se inyectó en el sistema un patrón de metionina de abundancia natural y la disolución patrón de metionina enriquecida en una concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  cada una. El procedimiento para el cálculo del enriquecimiento de la metionina marcada se describe a continuación [196]:

1) Cálculo de las distribuciones isotópicas experimentales para un clúster utilizando el patrón de abundancia natural ( $A_{exp}^i$ ). Para dicho clúster se monitorizó la masa monoisotópica  $M$  junto con las masas  $M-1$ ,  $M+1$ ,  $M+2$ , etc. Todas las distribuciones isotópicas fueron calculadas como la relación del área de cada pico para cada masa dividido por la suma de las áreas de todos los picos medidos en modo SIM.

2) Cálculo de las distribuciones isotópicas teóricas ( $A_{teo}^i$ ) utilizando un algoritmo polinomial basado en el método de Kubinyi. Se utilizó una hoja de Excel que permite calcular la distribución isotópica de moléculas de abundancia natural que contenga cualquier combinación de los átomos H, B, C, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, Se e I.

3) Cálculo de la pureza del clúster mediante la comparación de las distribuciones isotópicas experimentales de la metionina de abundancia natural medida ( $A_{exp}^i$ ) con las distribuciones isotópicas teóricas para el clúster elegido ( $A_{teo}^i$ ) utilizando la ecuación:

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{M-1} \\ A_{exp}^M \\ A_{exp}^{M+1} \\ \dots \\ A_{exp}^{M+n-2} \\ A_{exp}^{M+n-1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & A_{teo}^M \\ A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+1} & A_{teo}^{M+2} \\ \dots & \dots \\ A_{teo}^{M+n-2} & A_{teo}^{M+n-1} \\ A_{teo}^{M+n-1} & A_{teo}^{M+n} \end{bmatrix} x \begin{bmatrix} X_M \\ X_{M-1} \end{bmatrix} \quad (21)$$

Siendo:

$X_M$  y  $X_{M-1}$  las fracciones del espectro experimental correspondientes al clúster de masa M y masa M-1.

4) Cálculo del enriquecimiento isotópico de la metionina enriquecida haciendo uso de una hoja de cálculo preparado en Excel. Esta hoja de Excel calcula 100 distribuciones isotópicas diferentes de una molécula marcada ( $A_{cal}^i$ ) introduciendo el valor de la pureza del clúster previamente calculado con el patrón de abundancia natural mediante la ecuación:

$$\begin{bmatrix} A_{cal}^{M-1} \\ A_{cal}^M \\ \dots \\ A_{cal}^{M+n-2} \\ A_{cal}^{M+n-1} \end{bmatrix} = X_M x \begin{bmatrix} 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ \dots \\ A_{teo}^{M+n-1} \end{bmatrix} + X_{M-1} x \begin{bmatrix} A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ \dots \\ A_{teo}^{M+n-1} \\ A_{teo}^{M+n} \end{bmatrix} \quad (22)$$

Finalmente, las distribuciones isotópicas medidas para el compuesto marcada se comparan con las 100 distribuciones calculadas mediante regresión lineal. El enriquecimiento isotópico de la metionina será aquel que genere un menor residual entre las distribuciones isotópicas calculadas y experimentales.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

Los resultados de enriquecimientos obtenidos se muestran en la Tabla 13.

Metionina $^{34}\text{S}$	% $^{34}\text{S}$
Stock 1	82,4 $\pm$ 0,1
Stock 2	82 $\pm$ 0,1

**Tabla 13.** Caracterización de metionina enriquecida por GC-MS

Los valores obtenidos son ligeramente superiores a los obtenidos mediante dilución isotópica convencional con detección MC-ICP-MS, lo que podría achacarse a la presencia de algunas impurezas de azufre natural en la disolución patrón de metionina enriquecida. Estas impurezas no afectarían al cálculo del enriquecimiento por GC-MS dado que el mismo se realiza una vez derivatizada y separada la metionina de otros compuestos que pudieran estar presentes en el patrón, lo que explicaría que el enriquecimiento calculado sin separación cromatográfica sea ligeramente inferiores.

### **4.4- Cuantificación de metionina en productos dietéticos**

La disolución patrón de metionina enriquecida se ha utilizado para la cuantificación de metionina en productos dietéticos. Los productos dietéticos seleccionados consistían en pastillas de glicerina con un polvo blanco en su interior que correspondía con la L-metionina en su forma libre. Su composición era de 500 mg de metionina por cada pastilla. Se

adquirieron 3 productos de metionina de diferentes casas comerciales: Solaray, Solgar e Integralia.

El contenido de las pastillas se consiguió disolver tanto en en agua mili-Q caliente con agitación durante 30 min como con agua mili-Q a temperatura ambiente y sonicación. Por ello se seleccionó esta última opción con objeto de evitar cualquier proceso de oxidación de la metionina.

Una vez disuelto el contenido de la pastilla se diluía con una cantidad conocida de agua hasta obtener una concentración aproximada de 1 µg/g, de acuerdo con el contenido declarado por el fabricante.

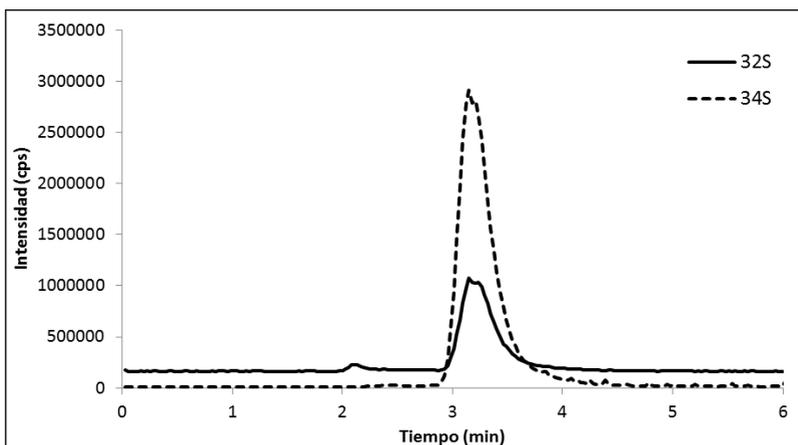
La cantidad de metionina presente en estos productos se determinó mediante dilución isotópica mezclando la disolución anterior con la disolución patrón de metionina enriquecida en una proporción de 1:3. En este caso se optó por separar la metionina cromatográficamente para asegurar la inexistencia de otros productos de azufre en el preparado dietético.

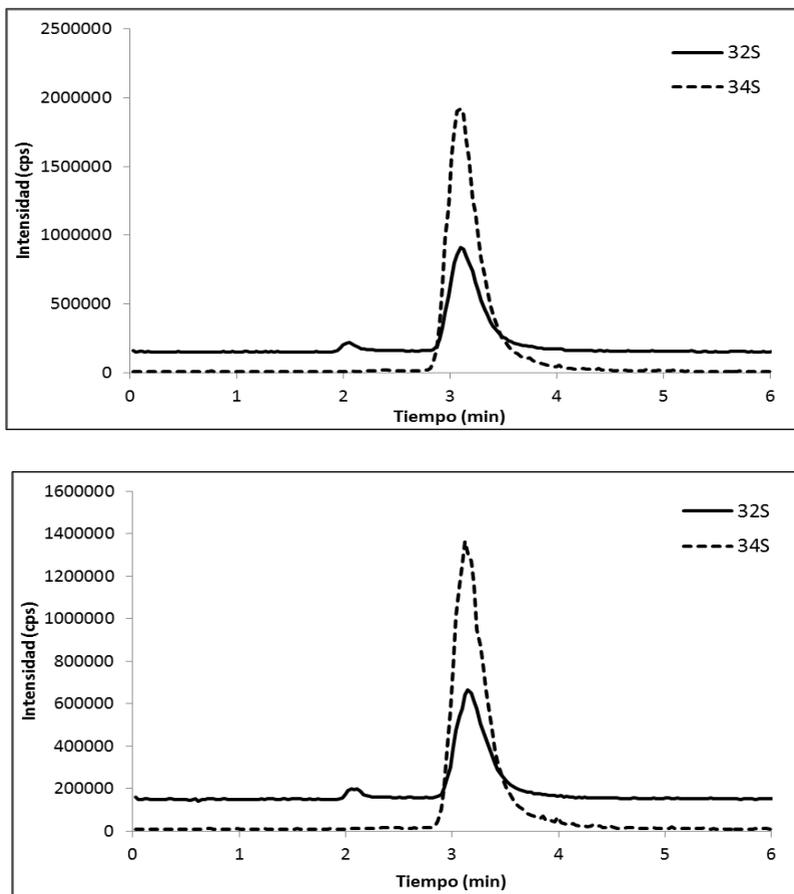
La cromatografía utilizada fue de fase reversa, con una columna cromatográfica Discovery BIO Wide Pore C18 (15 cm X 2.1 mm, 5 µm). Como fase móvil se utilizó una disolución de acetato de amonio 75 mM, pH 7.4 con 2% metanol en régimen isocrático. Se utilizó un flujo de 0,2 mL/min y la cantidad de muestra inyectada fue de 20 µL. La detección se realizó por DF-ICP-MS utilizando las condiciones de la Tabla 9.

En primer lugar se inyectó un patrón de Metionina de abundancia natural para comprobar el tiempo de retención con la cromatografía utilizada.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

Como se puede apreciar en la Figura 36, tanto la disolución de metionina enriquecida como las disoluciones de los 3 productos dietéticos dan lugar a un único pico cromatográfico que eluye al mismo tiempo de retención. Esto confirma que: a) la metionina es la única especie de azufre presente en estos productos dietéticos y, b) durante la puesta en disolución de las muestras no se produjo ningún proceso de oxidación de la metionina.





**Figura 36.** Cromatogramas de productos dietéticos con metionina  $^{34}\text{S}$ ,  
A) Solgar, B) Solaray, C) Integralia

Una vez obtenidos los cromatogramas se integraron las áreas de cada pico y se introdujeron en la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 7) para calcular la concentración de metionina en las muestras. Los 3

productos dietéticos se analizaron por triplicado. En la Tabla 14 se muestran el contenido de metionina por pastilla en cada uno de los 3 productos dietéticos.

<b>Producto dietético</b>	<b>Metionina/pastilla (mg)</b>
Solgar	493 ± 4
Solaray	494 ± 5
Integralia	491 ± 3

**Tabla 14.** Cantidad de metionina por pastilla obtenida para los productos dietéticos

Las cantidades de metionina por pastilla obtenidas para los 3 productos estudiados se correspondían con el 98-99% del valor declarado por el fabricante.

### **4.5- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo humano y de ratón**

La monitorización de metionina en sangre se realiza normalmente en población pediátrica para descartar la existencia de una aminoacidopatía, es decir, una alteración enzimática hereditaria que afecta al metabolismo catabólico de los aminoácidos. En el caso de la metionina, la enfermedad se denomina hipermetioninemia, y se caracteriza por un exceso de metionina en el cuerpo humano. En este

caso el paciente no muestra signos de la enfermedad, pero, si no es tratado, puede causar retrasos mentales y otros problemas neurológicos como debilidad muscular, problemas en el hígado, etc.

También se monitoriza la metionina en sangre cuando se quiere evaluar el estado nutricional de ciertos pacientes como aquellos con enfermedad hepática, renal, neoplásica, quemados, con desórdenes endocrinológicos, etc.

Como ya se comentó en la introducción de esta Tesis Doctoral, en los últimos años se está estudiando en profundidad la relación entre el cáncer y la dependencia de metionina de las células tumorales. En muchos estudios se está evaluando la depleción de metionina en la dieta junto con medicamentos antitumorales como medio para tratar la enfermedad. En estos estudios es necesario medir la concentración de metionina en la sangre de los pacientes.

La monitorización de la metionina se realiza en los laboratorios clínicos de los hospitales, utilizando normalmente cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con nihidrina y detección UV-VIS. En nuestro caso hemos puesto a punto un método para la separación de la metionina de otros compuestos de azufre utilizando cromatografía de fase reversa C18 y detección ICP-MS de doble enfoque. Para la cuantificación de la metionina natural presente en las muestras se utilizó una disolución stock de metionina enriquecida en azufre 34 previamente obtenida en nuestro laboratorio.

### **4.5.1- Tratamiento de la muestra**

Una vez extraída la sangre, hay que separar el plasma del suero. Este proceso se realiza por centrifugación a alta velocidad (10.000 g). El plasma así obtenido puede utilizarse inmediatamente o almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su futuro uso.

El siguiente paso consistió en la precipitación de las proteínas plasmáticas. Se ensayaron dos reactivos para este proceso, ácido tricloroacético (TCA) y ácido trifluoroacético (TFA). Los mejores resultados se obtuvieron con el TFA, ya que el TCA degradaba la metionina no pudiendo monitorizarse en el ICP-MS.

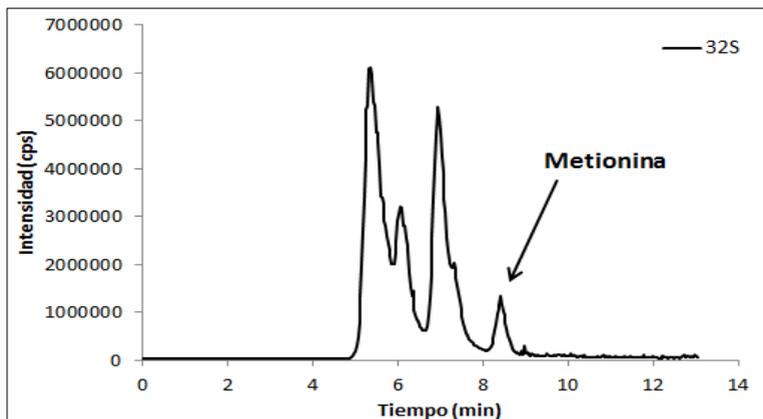
El ácido trifluoroacético se añadía en una relación 10 veces mayor que el volumen del plasma. A continuación, la mezcla se introducía en un baño de hielo durante 15 minutos para favorecer la precipitación de las proteínas. Después se centrifugaban los tubos a 15.000 g durante 5 minutos y se recogía el sobrenadante.

Este tratamiento se realizó tanto para las muestras de sangre humana como la sangre procedente de ratones de laboratorio.

### **4.5.2- Separación cromatográfica con detección ICP-MS**

El método utilizado para la separación de la metionina antes de su detección por ICP-MS fue el mismo que en la aplicación anterior. La detección de la metionina se realizó con un ICP-MS de doble enfoque utilizando las condiciones de la Tabla 9.

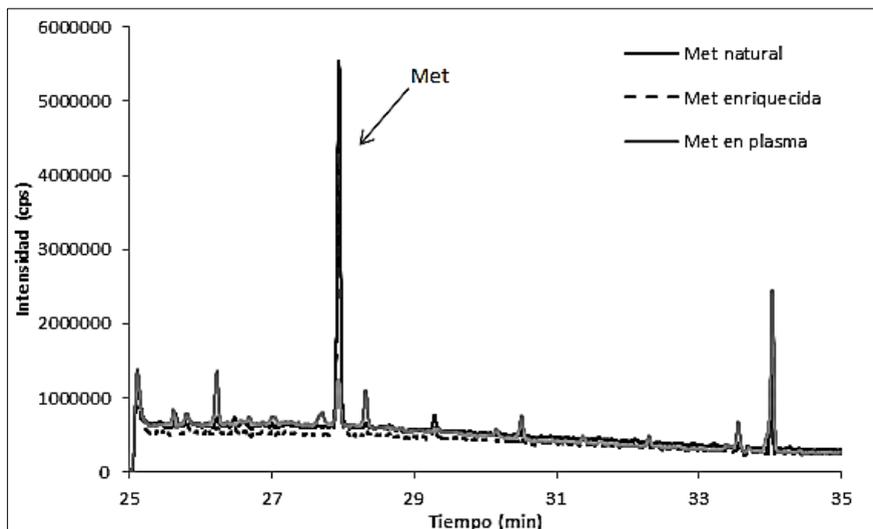
En la Figura 37 se observa un cromatograma típico cuando se inyecta 20  $\mu\text{L}$  del plasma obtenido de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito. Se puede observar que la metionina eluye 8-9 minutos.



**Figura 37.** Cromatograma obtenido para muestra de plasma sanguíneo tras la precipitación de proteínas

### **4.5.3- Identificación mediante GC-MS**

Con objeto de identificar que el compuesto que eluye a los 8-9 minutos se corresponde con la metionina del plasma humano se procedió a su identificación mediante GC-MS. Para ello se recogieron fracciones al tiempo al que aparecía este compuesto (8-8,5 minutos). Las fracciones se preconcentraron y derivatizaron siguiendo la metodología expuesta en el apartado 4.4. La muestra de plasma sanguíneo derivatizada se inyectó en el equipo de GC-MS. También se inyectaron un patrón de metionina de abundancia natural y un patrón metionina enriquecida en azufre 34 con fines comparativos.



**Figura 38.** Cromatograma GC-MS de un patrón natural, un patrón enriquecido y una muestra de plasma sanguíneo

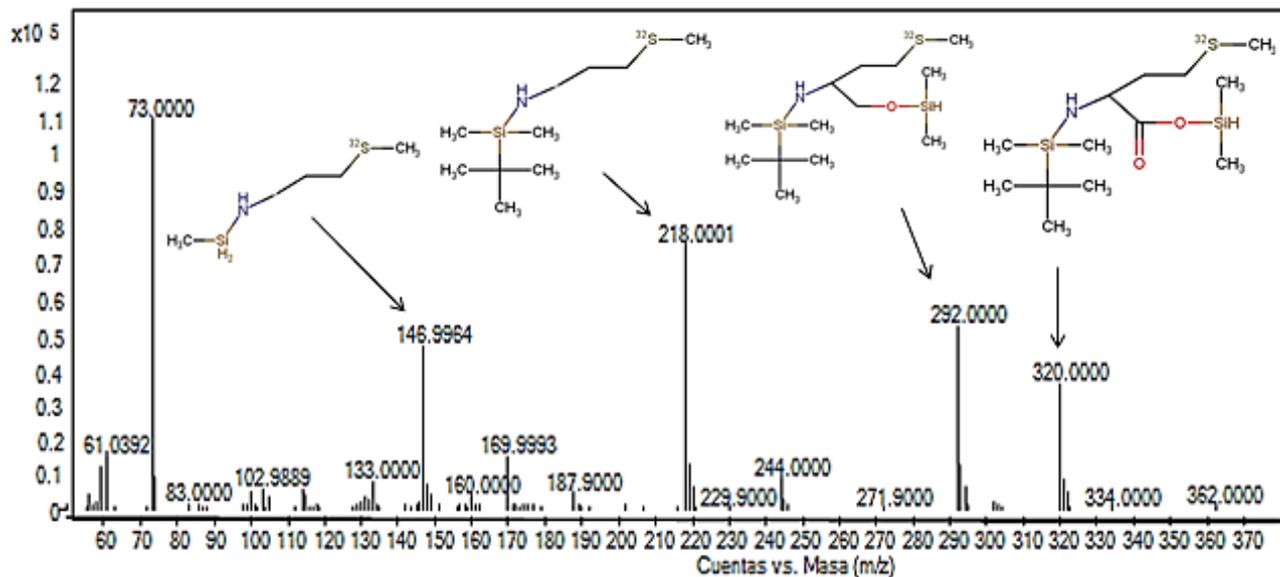
Como se puede apreciar en la Figura 38, la metionina aparece a los 27.9 minutos. El resto de picos se corresponden a fragmentos procedentes del reactivo derivatizante. En el caso del plasma sanguíneo aparecen adicionalmente otros picos menos intensos que se corresponden con la serina (28,3 minutos), fenilalanina (30,1 minutos), prolina (27,7 minutos) y dos ácidos grasos (42,1 y 42,3 minutos). Ninguno de estos compuestos contiene azufre en su estructura por lo que no deberían afectar a la cuantificación de la metionina en el equipo de ICP-MS.

Por último se obtuvo el espectro de masas. Los espectros de masas de la metionina natural y la metionina enriquecida en azufre 34 se muestran en la figura 34 y 35 respectivamente. El espectro obtenido a

partir de la metionina procedente del plasma sanguíneo aparece en la Figura 39.

Este espectro de masas es el mismo que el obtenido para el patrón de metionina natural (Figura 34), por lo que se puede afirmar que el compuesto que eluye en el cromatograma de la Figura 38 a los 27,9 minutos es metionina.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$



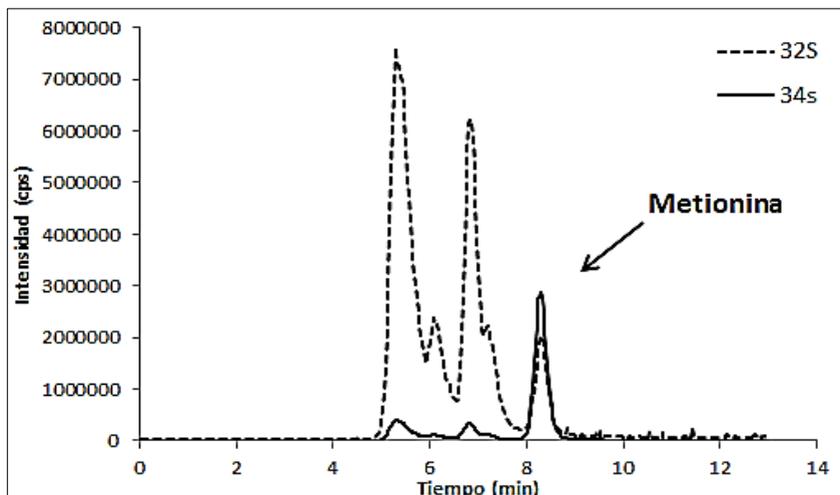
**Figura 39.** Espectro de masas de metionina en plasma sanguíneo derivatizada

#### **4.5.4- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo humano**

Para la cuantificación de metionina en este tipo de muestras se utilizó la disolución patrón de metionina enriquecida previamente caracterizada. Esta disolución patrón se mezclaba con la muestra de plasma antes de realizar la precipitación de proteínas con el ácido trifluoroacético. Se añadía el volumen necesario (2  $\mu\text{L}$  de disolución patrón de metionina enriquecida sobre 100  $\mu\text{L}$  de plasma) para obtener una relación aproximadamente 1:1 entre la metionina natural esperada en el plasma y la metionina enriquecida. Finalmente se procedía a la precipitación de proteínas plasmáticas con TFA como ha sido previamente descrito, y se centrifugaba a alta velocidad (15.000 g) para recoger el sobrenadante. Después se llevaba la muestra al sistema cromatográfico HPLC con detección ICP-MS.

En la Figura 40 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos. La metionina aparecía a un tiempo de retención de 8-9 minutos separada de los otros compuestos de azufre presentes en la muestra. Se integraron las áreas de la metionina enriquecida y la metionina natural para llevarlas a la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 7) y poder cuantificar la metionina natural presente en el plasma.

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$



**Figura 40.** Cromatograma de plasma añadiendo metionina enriquecida

Esta metodología se aplicó a 13 muestras de plasma humano obtenidas en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Para validar nuestra metodología se realizó una comparativa de nuestros resultados con los que se obtuvieron en el hospital mediante un método diferente que consistía en la separación de los aminoácidos por HPLC de intercambio iónico y detección UV-VIS utilizando la nihidrina como reactivo colorimétrico derivatizante. En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

Nº Muestra	Resultados obtenidos en el HUCA (μmoles/L)	Resultados obtenidos por nuestro método (μmoles/L)
1	18	18
2	25	25
3	31	31
4	21	22
5	14	14
6	27	26
7	29	30
8	18	18
9	25	26
10	16	17
11	32	32
12	24	25
13	35	35

**Tabla 15.** Concentración de metionina en plasma sanguíneo humano

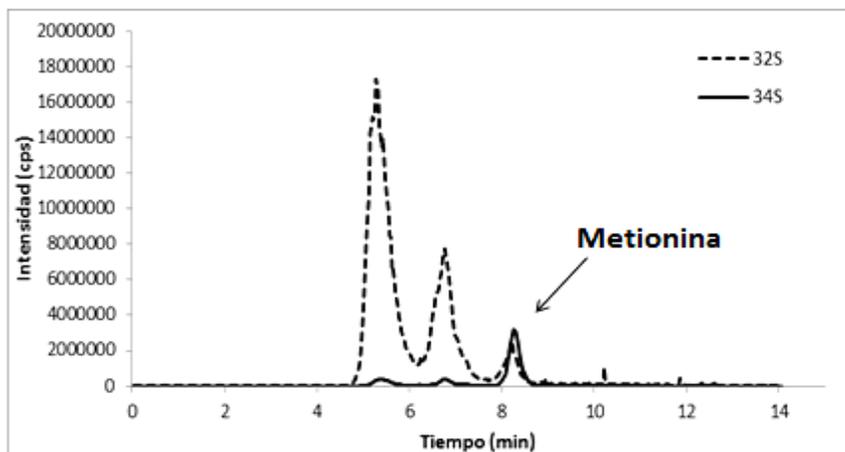
En la Tabla 15 no se ofrecen resultados con más cifras significativas con objeto de poder compararlos con los valores ofrecidos por el HUCA.

Para comparar los resultados se llevó a cabo un test estadístico de contraste t para datos emparejados. Para 12 grados de libertad con un 95% de probabilidad, la t tabulada era de 2,18, mientras que la experimental fue de 1,69, por lo que no hay evidencias de que los dos métodos ofrezcan resultados diferentes.

### 4.5.5- Cuantificación de metionina en plasma sanguíneo de ratones

Como paso previo a los estudios con ratones, se procedió a cuantificar la metionina presente en plasma sanguíneo de ratones de laboratorio sanos y enfermos de cáncer de próstata. El tratamiento de la muestra fue el mismo que el utilizado en el caso del plasma sanguíneo humano, adicionando una cantidad conocida de la disolución de metionina enriquecida y precipitando las proteínas plasmáticas con TFA. Después de la centrifugación a alta velocidad se recogió el sobrenadante y se inyectó en el sistema cromatográfico con detección ICP-MS.

En la Figura 41 se muestra un cromatograma del plasma de un ratón. Al igual que en el caso del plasma humano, la metionina aparecía a un tiempo de retención de 8-9 minutos y se encontraba separado de los otros compuestos de azufre.



**Figura 41.** Cromatograma de plasma sanguíneo de ratón

Se cuantificó la metionina en 7 muestras de plasma de ratón, siendo 3 ratones sanos y 4 ratones enfermos de cáncer de próstata. En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos.

Nº Muestra	Estado del ratón	Resultados obtenidos (µg/g)
1	Sano	11 ± 1
2	Sano	16 ± 2
3	Sano	15 ± 1
4	Cáncer de próstata	15 ± 2
5	Cáncer de próstata	12 ± 1
6	Cáncer de próstata	12 ± 1
7	Cáncer de próstata	13 ± 1

**Tabla 16.** Concentración de metionina en plasma sanguíneo de ratón

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de metionina presente en el plasma de ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata.

#### **4.5.6- Estudios de recuperación**

Adicionalmente se realizaron estudios de recuperación. Para ello, se adicionó metionina natural al plasma sanguíneo en tres niveles de concentración crecientes: 2, 4 y 8 ppm. La cantidad de metionina se determinó como en el caso anterior mezclando 100 µL de plasma con 2 µL de metionina enriquecida y el volumen necesario de un patrón de metionina natural para cada nivel de concentración antes de la precipitación de las proteínas plasmáticas. En este caso se determinó la

#### 4- Síntesis de levadura enriquecida en $^{34}\text{S}$

---

concentración de la metionina en la muestra con y sin fortificación con la metionina natural. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

<b>Estudio de recuperación</b>	<b>Met. natural añadida (ppm)</b>	<b>Concentración met. natural teórica (ppm)</b>	<b>Concentración met. natural hallada (ppm)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
1	2	7,19	7,08	98,4
2	4	9,19	9,24	100,5
3	8	13,19	13,09	99,2

**Tabla 17.** Estudios de recuperación en muestras de plasma sanguíneo

Como se puede observar, las recuperaciones estaban en torno al 100% para los tres niveles de concentración añadidos, lo que supone una validación adicional de nuestra metodología.

## **4.6- Conclusiones**

1- Se ha mejorado el procedimiento para la obtención de levadura enriquecida en azufre 34 evitando en la medida de lo posible la contaminación por azufre de abundancia natural. El enriquecimiento en el isótopo 34 del azufre era en todos los casos superior al 91%, mejorando hasta en un 25% el valor obtenido en los trabajos previos a la presente tesis doctoral.

2- Se consiguió extraer y aislar metionina enriquecida en azufre 34 a partir de los cultivos de levaduras obteniendo así una disolución patrón de la misma. Se ha podido identificar la metionina en esta disolución patrón a partir de los espectros de fragmentación obtenidos mediante GC-MS. Además, se ha caracterizado en concentración y abundancia.

3- La disolución patrón de metionina enriquecida se ha utilizado para la determinación de metionina en productos dietéticos y plasma sanguíneo utilizando el método de análisis por dilución isotópica junto con la separación cromatográfica del compuesto de interés por cromatografía HPLC de fase reversa y detección ICP-MS. En el caso de los productos dietéticos la cantidad encontrada coincidía con la declarada por el fabricante. En el caso del plasma sanguíneo los resultados han podido ser validados mediante comparación estadística con los valores obtenidos en el HUCA por un procedimiento analítico distinto así como mediante estudios de recuperación.



---

**5- Desarrollo de una  
metodología analítica  
cuantitativa para la  
monitorización de  
metabolitos de azufre en  
orina**



## **5.1- Desarrollo y optimización del sistema cromatográfico HPLC**

Para la monitorización de los metabolitos de azufre en orina de animales de laboratorio fue necesario desarrollar un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Nos interesaba separar el mayor número posible de compuestos además de lograr el mejor perfil de pico para cada uno de ellos. Por este motivo, se hicieron pruebas con diferentes tipos de cromatografías de líquidos (fase reversa, pares iónicos, intercambio catiónico) para elegir la más adecuada.

En los estudios iniciales se utilizaron tanto patrones de azufre de compuestos que pudieran estar presentes en la orina como muestras reales de orina procedente de ratas de laboratorio. Los patrones de azufre elegidos fueron: metionina, cisteína, homocisteína, homocistina, taurina, sulfatos, tiosulfatos, tiocianato y glutatión reducido.

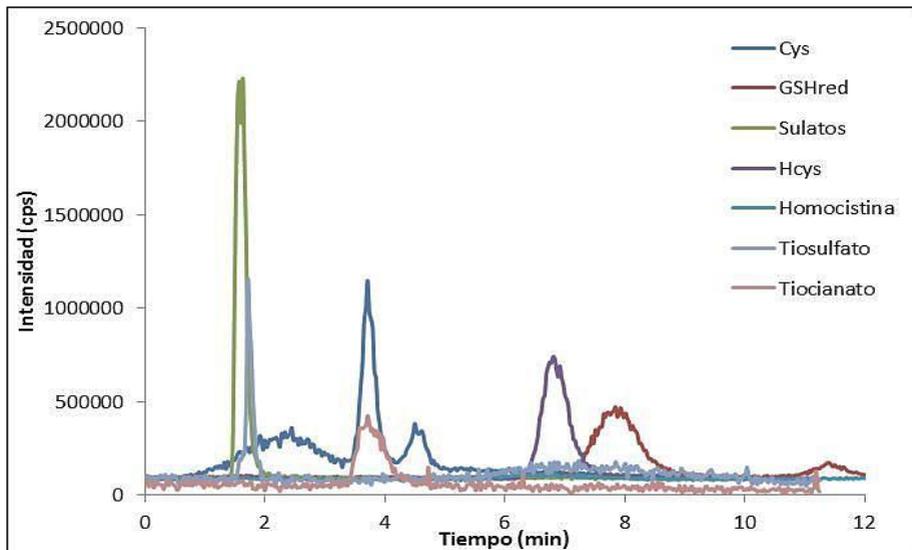
Como sistema de detección se utilizó el equipo ICP-MS de doble enfoque empleando las condiciones experimentales recogidas en la Tabla 8.

### **5.1.1- Cromatografía de intercambio catiónico**

Para este tipo de cromatografía se utilizó una columna de intercambio catiónico Dionex Ionpac CS12A con una precolumna CG12. Como fase móvil se utilizó acetato de amonio 30 mM a pH 3 en régimen isocrático a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó un bucle de inyección de 100 µL.

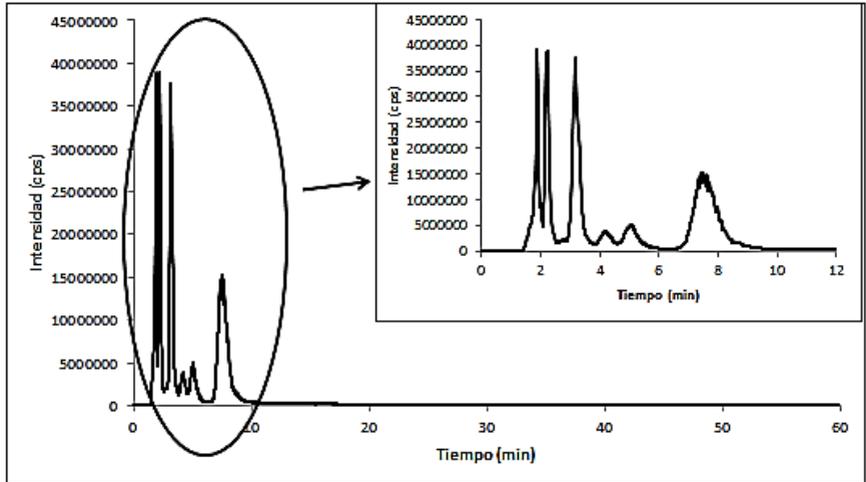
## 5- Desarrollo de una metodología analítica

En primer lugar se estudiaron los tiempos de retención de diferentes patrones de azufre en este tipo de cromatografía. La mayor parte de estos compuestos eluían antes de los 10 minutos. Como se puede observar en la Figura 42 el glutatión reducido y la homocisteína aparecieron separados, mientras que la cisteína, sulfatos, homocistina tiosulfato y tiocianato no se separaron.



**Figura 42.** Cromatogramas de patrones de azufre por intercambio catiónico (concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  para todos los compuestos)

Posteriormente se inyectó una muestra de orina de rata en las mismas condiciones. Se dejó correr el cromatograma durante 1 hora para facilitar que todos los compuestos eluyeran de la columna y no quedase ninguno retenido. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 43, todos los compuestos eluyeron antes de los 10 minutos.



**Figura 43.** Cromatograma de orina de rata en intercambio catiónico y ampliación de la zona hasta 12 minutos

Si nos centramos en los primeros 10 minutos del cromatograma se observan al menos 6 picos cromatográficos cuyos tiempos de retención coinciden únicamente con el patrón de azufre glutatión reducido, si bien no es posible asignar con certeza los picos del cromatograma de la Figura 43 por cuanto es conocido que la presencia de sales en concentración elevada (como ocurre en la orina) afecta notablemente a los tiempos de retención en este tipo de cromatografía.

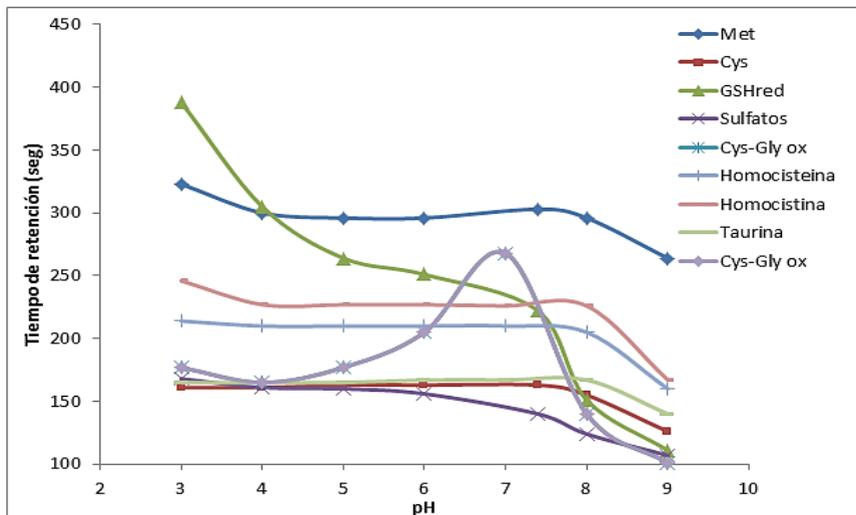
## **5.1.2- Cromatografía líquida de fase reversa**

### **Cromatografía de fase reversa con fase móvil TRIS-HCl**

El siguiente paso consistió en ensayar la separación de los metabolitos de azufre presentes en la orina en base a su polaridad con una cromatografía de fase reversa. Se comenzó utilizando una columna cromatográfica Mediterranea Sea 18 (25 x 0,46 cm, 5  $\mu$ m). Como fase móvil se utilizó una disolución de Tris-HCl 30 mM en régimen isocrático a un flujo de 1 mL/min.

Como en el caso anterior, se realizó un estudio de los tiempos de retención para diferentes patrones de azufre. En este caso se optimizó el pH de la fase móvil variando el pH de trabajo desde 2 hasta 9.

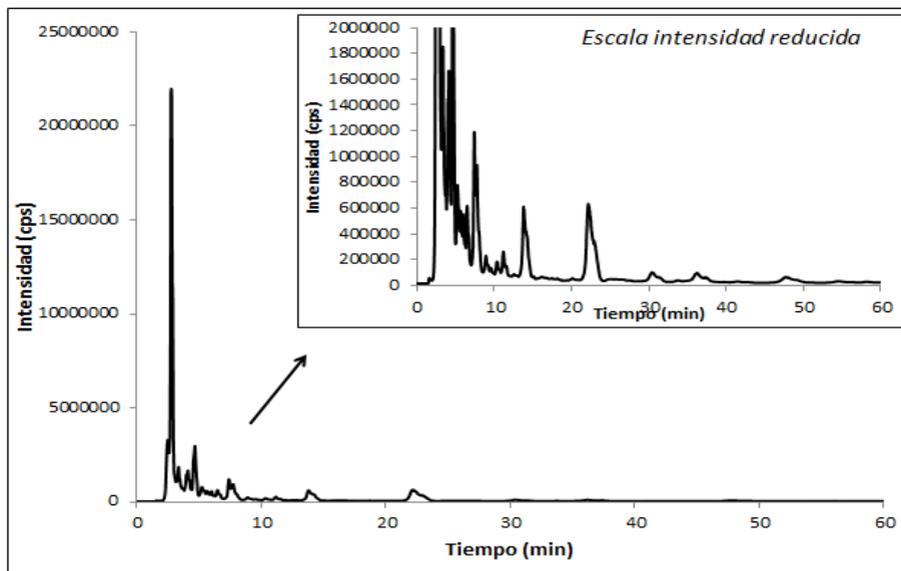
Si bien no se encontró un pH en el que todos los compuestos estuvieran perfectamente separados (Figura 44), se optó por seleccionar un valor de compromiso de 7,4 para los futuros experimentos.



**Figura 44.** Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH en fase reversa con Tris-HCl 30 mM y columna Mediterranea Sea 18 (concentración de 5 µg/g para todos los compuestos)

Se procedió a continuación a inyectar una muestra de orina de rata para evaluar el perfil cromatográfico de los metabolitos de azufre. Al igual que hicimos con el intercambio catiónico, dejamos correr una hora el cromatograma para que eluyeran todos los posibles metabolitos de azufre. Como se puede observar en la Figura 46, aparecía un pico inicial de elevada intensidad junto con otros picos menos intensos a lo largo del cromatograma. Si se reduce la escala puede apreciarse con claridad los picos cromatográficos menos intensos que aparecen tras el enorme pico inicial (Figura 45).

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

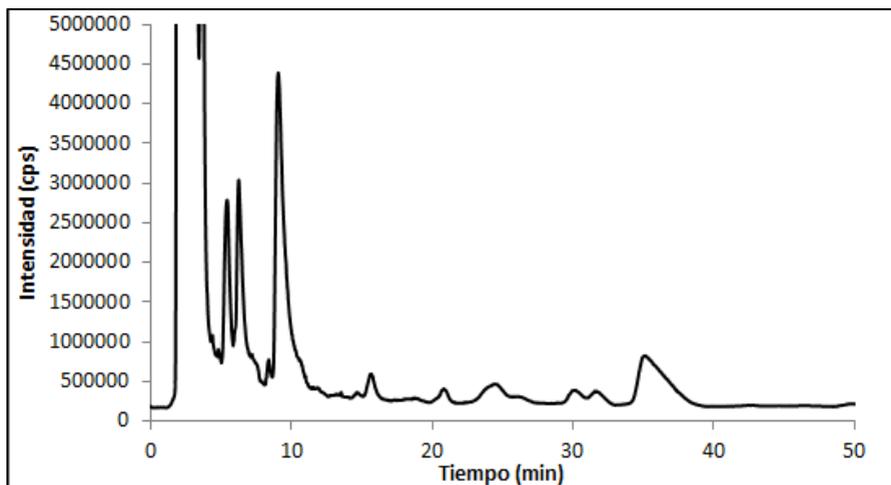


**Figura 45.** Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, pH 7,4 y columna Mediterranea Sea 18

Así pues, el número de picos cromatográficos que se obtienen con cromatografía de fase reversa es mucho mayor que los obtenidos por cromatografía de intercambio catiónico. Además, aparecen distribuidos a lo largo de un periodo de tiempo mayor, lo que potencialmente implicaría mayores posibilidades de optimización. Por todo ello, se decidió continuar los siguientes experimentos con este tipo de cromatografía y abandonar la cromatografía iónica.

En otro intento por mejorar la separación cromatografica de las muestras de orina de rata, se utilizó una nueva columna de fase reversa con un diámetro de columna menor, Discovery BIO Wide Pore C18 (15

cm X 2,1 mm, 5  $\mu$ m). Al reducir el diámetro de la columna esperábamos que la resolución de los picos cromatográficos mejorara (Figura 46).



**Figura 46.** Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, pH 7, 4 con columna Discovery BIO Wide Pore C18

El uso de esta nueva columna mejoraba el perfil de los picos por lo que a partir de ese momento fue la que utilizamos en los siguientes experimentos. Además, al reducir las dimensiones de la columna se pudo reducir el flujo de fase móvil de 1 mL/min a 200  $\mu$ L/min.

Esta reducción posibilitó la opción de añadir pequeñas cantidades de disolventes orgánicos a la fase móvil con un doble objetivo: a) mejorar la separación cromatográfica y, b) intentar reducir el tiempo total del cromatograma haciendo que los últimos picos cromatográficos eluyesen antes.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

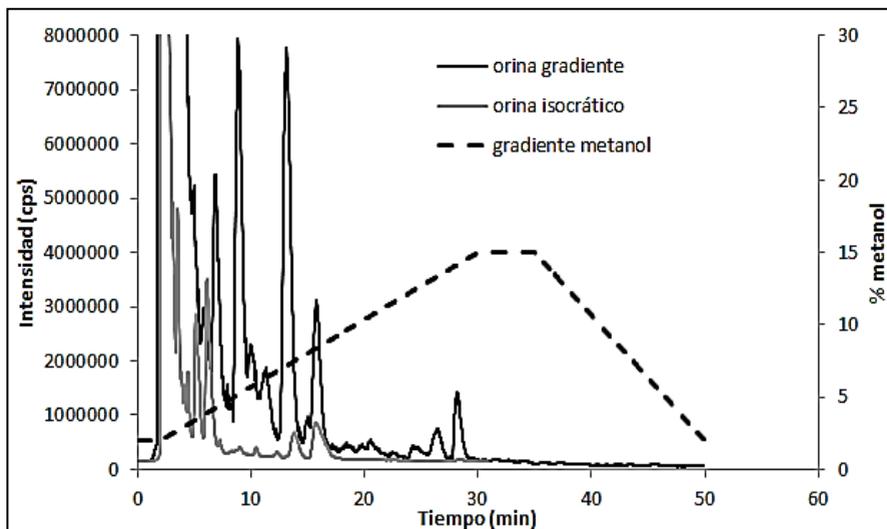
---

Para ello, se diseñó un gradiente en el que se introducía hasta un 10 % de metanol (Tabla 18). No se ensayaron concentraciones mayores de metanol ya que podrían provocar la eventual extinción del plasma

Tiempo (min)	% Tris-HCL 30 mM, pH 7.4	% Metanol	Flujo ( $\mu$ L/min)
0	90	2	200
1	90	2	200
15	10	10	200
20	10	10	200
25	90	2	200
30	90	2	200

**Tabla 18.** Gradiente utilizado con Tris-HCl 30 mM, pH 7, 4 con columna Discovery BIO Wide Pore C18

En la Figura 47 se observa una comparativa entre los cromatogramas obtenidos para una orina de rata con y sin gradiente. Se aprecia que al aumentar la cantidad de metanol los picos cromatográficos empiezan a aparecer antes. Desafortunadamente, también se observa un gran descenso de la sensibilidad lo que imposibilita la detección de los compuestos de azufre eluidos a partir de los 30 minutos.



**Figura 47.** Cromatogramas de orina de ratas obtenidas con cromatografía de fase reversa en régimen isocrático y en gradiente

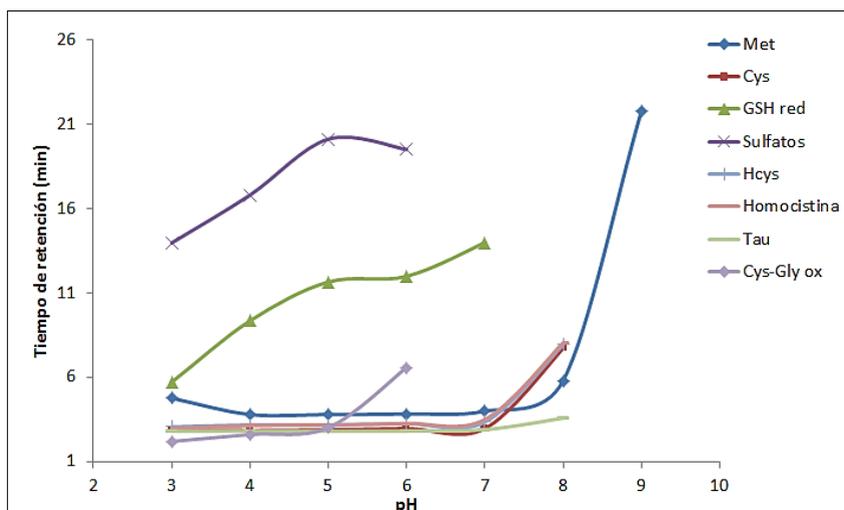
### **Cromatografía de fase reversa con reactivos de pares iónicos**

Se utilizaron dos reactivos de pares iónicos como son el tetrametilamonio y el tetrabutylamonio. Estas especies se añadieron a la fase móvil de la cromatografía de fase reversa para intentar mejorar la separación de los compuestos. En teoría, estas especies formarían pares iónicos con los analitos de azufre cargados negativamente presentes en la orina y que presumiblemente aparecerían sobre la cola del pico cromatográfico inicial de sulfatos. De este modo, se pretendía promover el retraso de alguno de los analitos que aparecerían al principio del cromatograma.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

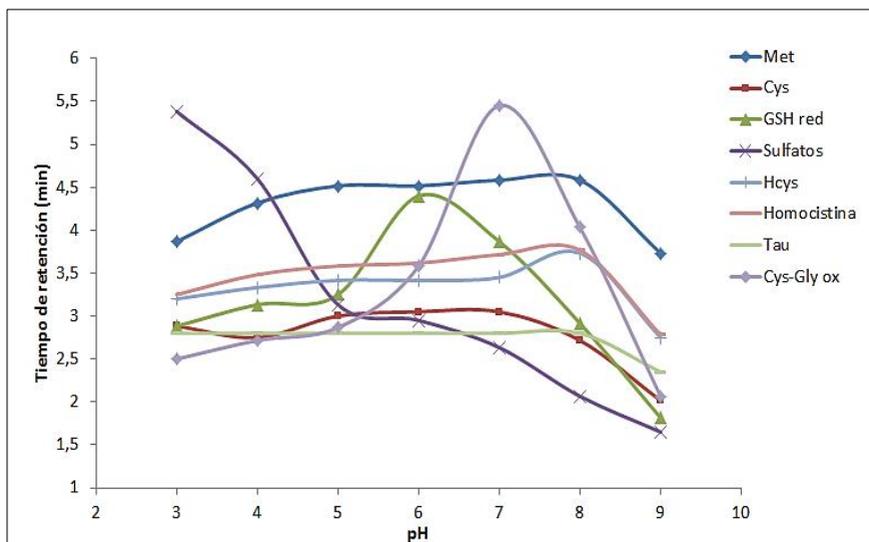
Las fases móviles utilizadas fueron disoluciones de Tris-HCl 30 mM a las cuales se añaden tetrabutilamonio o tetrametilamonio hasta una concentración 5 mM en ambos casos, en régimen isocrático.

Se estudió la variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre al ir variando el pH entre 2 y 9. Para el caso del tetrabutilamonio, al aumentar el pH de trabajo algunos de los patrones de azufre glutatión reducido, sulfatos, cisteinín-glicina oxidada quedaban retenidos en la columna y no eluían de la misma. Por ello se decidió trabajar a un pH 5, donde a pesar de que la metionina, taurina, homocistina, homocisteína y cisteína no estaban separados si, al menos eluían de la columna (Figura 48).



**Figura 48.** Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH utilizando tetrabutilamonio 5 mM (concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  para todos los compuestos)

Para el caso del tetrametilamonio, los patrones eluían de la columna cromatográfica a todos los pHs estudiados. Se eligió un pH 7 como óptimo de trabajo ya que era el pH al que se observaba una mejor separación (Figura 49).

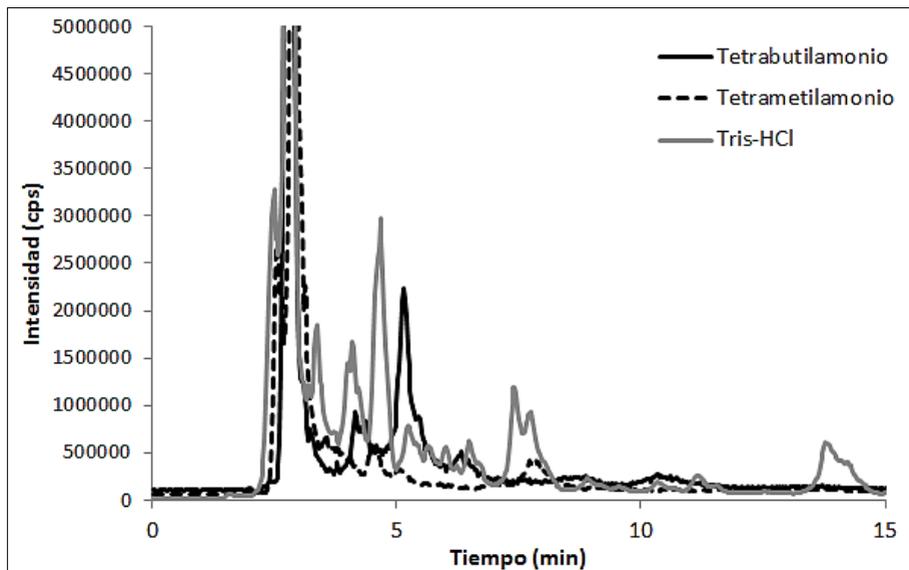


**Figura 49.** Variación de los tiempos de retención de los patrones de azufre con el pH utilizando tetrametilamonio 5 Mm (concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  para todos los compuestos)

Una vez establecidos los pH óptimos en la separación de patrones de azufre, se procedió a inyectar las muestras de orina de rata. Tanto con el tetrabutilamonio como con el tetrametilamonio (Figura 50), se observó que los analitos de azufre eluían a unos tiempos de retención similares a los obtenidos con la cromatografía de fase reversa convencional. Así pues, el esperado retraso en los picos cromatográficos que aparecían al principio del cromatograma sobre la

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

cola de la señal de sulfato no se produjo en las condiciones ensayadas por lo que se optó por abandonar este tipo de cromatografía.

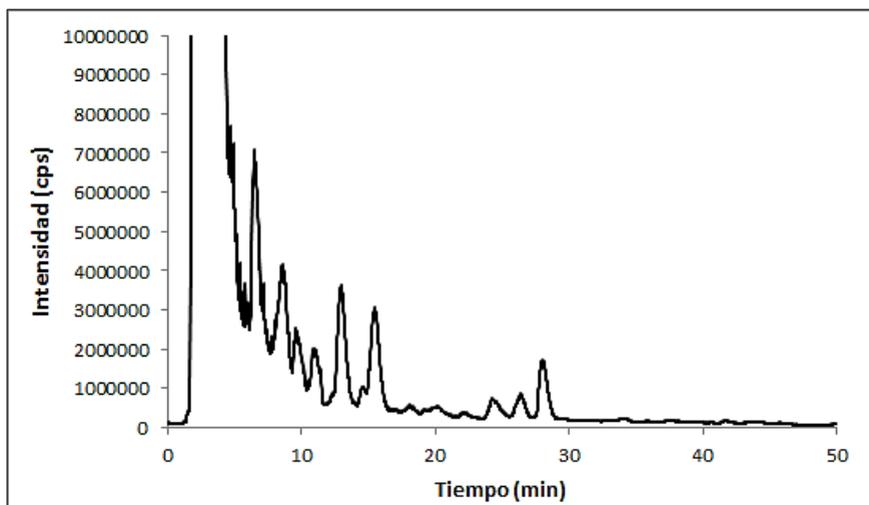


**Figura 50.** Cromatograma de orina de rata en fase reversa con Tris-HCl 30 mM, tetrabutylammonio 5mM y tetrametilammonio 5mM

### **Cromatografía de fase reversa con fase móvil acetato de amonio**

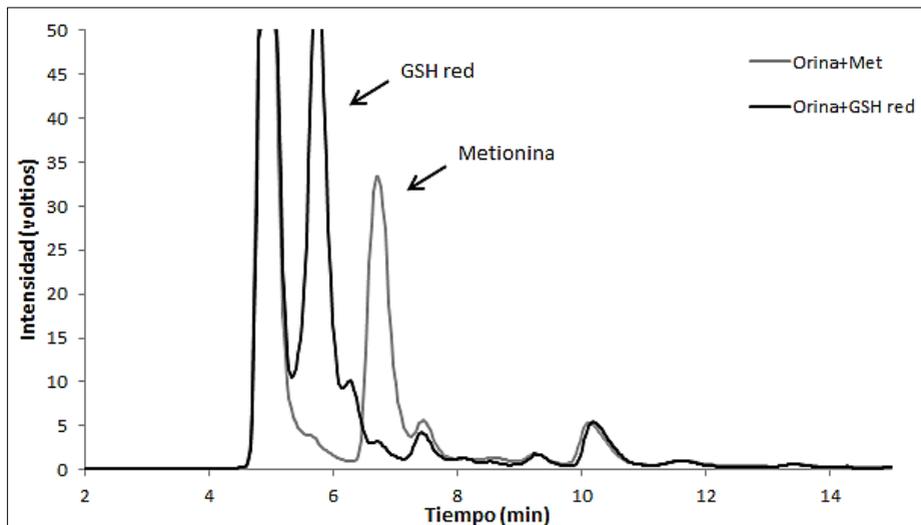
Otro de los ensayos realizados fue cambiar la reguladora de TRIS-HCl por una reguladora de ácido acético/acetato de amonio que ya se había ensayado con éxito en estudios previos [81]. La columna cromatográfica utilizada fue una Discovery BIO Wide Pore C18 (15 cm X 2,1 mm, 5  $\mu$ m). La fase móvil contenía una reguladora de ácido acético/acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% metanol en régimen isocrático.

Con esta fase móvil se observó una mejoría notable en la resolución de los picos cromatográficos con respecto a las anteriores fases móviles, tal como se puede observar en la Figura 51. Se seleccionó por tanto esta fase móvil para los siguientes experimentos.



**Figura 51.** Cromatograma de orina de rata en fase reversa con acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% de metanol

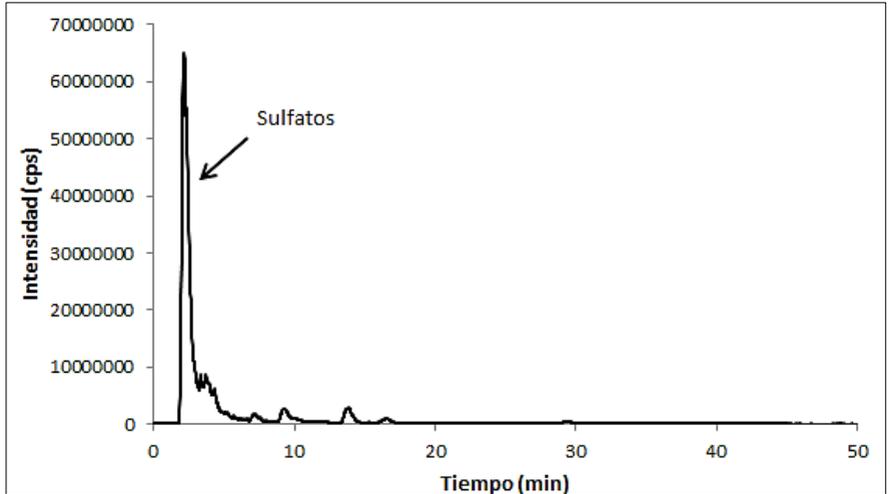
Por otro lado, se fortificaron muestras de orina de rata con diferentes patrones de azufre para intentar identificar algún pico del cromatograma obtenido con la nueva fase móvil. Solamente la metionina (6,6 minutos) y el glutatión reducido (5.5 minutos) aparecían separados del gran pico cromatográfico de los sulfatos como se puede apreciar en la Figura 52. El resto de patrones de azufre que se probaron (cisteína, taurina, tiosulfatos, cisteinín-glicina oxidada, cistationina, homocistina) aparecían subsumidos dentro del pico inicial de los sulfatos.



**Figura 52.** Cromatograma de orina de rata fortificada con metionina y GSH reducido ( $20 \mu\text{g/g}$ ) en fase reversa con acetato de amonio  $75 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,4$  y un  $2\%$  de metanol

### 5.1.3- Eliminación de los sulfatos de las muestras de orina

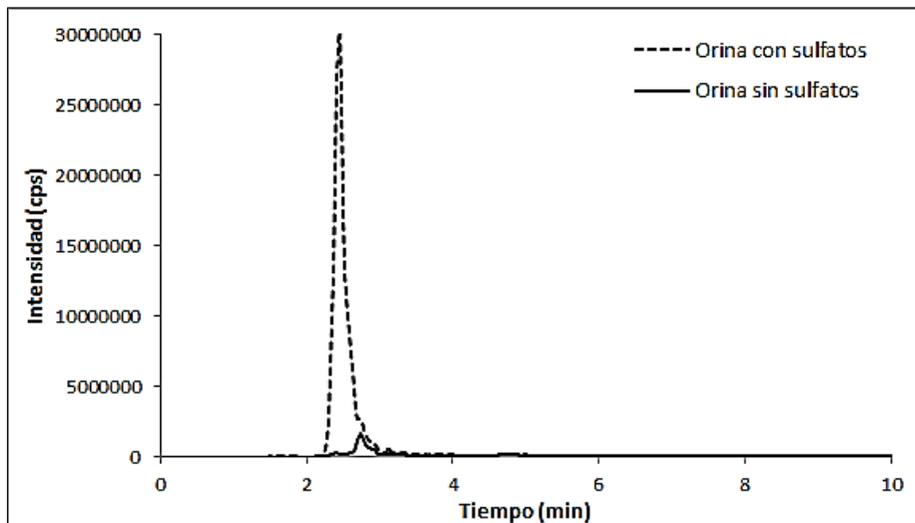
Como se ha comentado, uno de los problemas del análisis de las muestras de orina era la elevada señal cromatográfica correspondiente a los sulfatos (Figura 53). En muchos casos la señal era tan intensa que llegaba a saturar el detector. Además, sobre la cola aparecían otros picos cromatográficos.



**Figura 53.** Cromatograma de orina de rata en fase reversa con acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 y un 2% de metanol

Para evitar este problema se evaluó la posibilidad de precipitar los sulfatos con cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) antes de proceder a la separación cromatográfica.

La cantidad idónea para reducir los sulfatos al máximo posible sin añadir un exceso del reactivo resultó ser de 1 mL de cloruro de bario al 5% por cada 3 mL de orina. El precipitado del sulfato de bario se separaba mediante centrifugación a alta velocidad (10.000 rpm) y posteriormente se filtraba el sobrenadante con filtros de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Al inyectar la orina tras este tratamiento se obtenían cromatogramas con una señal inicial de sulfatos muy reducida, como se puede observar en la Figura 54.



**Figura 54.** Reducción de la señal de los sulfatos tras el tratamiento previo con cloruro de bario 5%

Desafortunadamente, se observó que este tratamiento también afectaba a la señal de otros compuestos que desaparecían de los cromatogramas. Además, el tamaño de partícula del precipitado de sulfato de bario era muy pequeño por lo que resulta tremendamente difícil de separar y por tanto se corría el riesgo de obturar las columnas cromatográficas. Por todo esto se decidió finalmente no utilizar este tratamiento para las muestras de orina en los siguientes experimentos.

## **5.2- Evaluación y optimización del acoplamiento de un sistema de desolvatación**

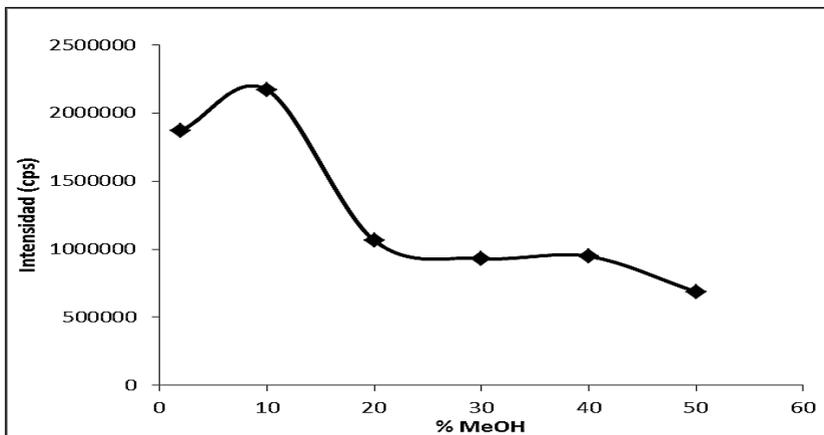
El acoplamiento de la cromatografía de fase reversa con la técnica ICP-MS presenta la limitación del porcentaje máximo de disolvente orgánico que puede ser introducido en las fases móviles sin que se produzca la extinción del plasma. Con objeto de superar esta limitación, se procedió a evaluar un sistema de desolvatación. El sistema de desolvatación ensayado fue el Aridus II de la casa comercial Cetac, cuyo funcionamiento se ha explicado anteriormente.

En primer lugar, se optimizaron los flujos de los gases del equipo de desolvatación, es decir cómo eran el flujo externo de argón (“Sweep Gas”) y el gas adicional (nitrógeno). Se estudió la sensibilidad de la señal de azufre en el equipo ICP-MS cuando se variaban los flujos de estos gases. Para ello se utilizó una disolución de azufre de abundancia natural de  $1\mu\text{g/g}$ . Se encontró que para obtener la máxima sensibilidad el flujo de argón había que ajustarlo diariamente en función de las condiciones del equipo ICP-MS. Por otro lado, se observó que el uso del gas adicional reducía drásticamente la sensibilidad de la señal de azufre, a pesar de que el propio fabricante recomendaba un flujo entre 2-10 L/min de este gas. Por ello, en nuestros experimentos no se utilizó el gas adicional.

Se estudió también el cambio de la sensibilidad del detector al aumentar la cantidad de metanol. Para ello, se utilizó una disolución de un patrón de azufre con una concentración de  $5\mu\text{g/g}$  a la cual se fue aumentando la cantidad de metanol entre 0-50%. Como se puede observar en la Figura 55, al aumentar la cantidad de metanol se

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

produce una ligera pérdida de la sensibilidad, pero muy pequeña en comparación con lo que sucedía en condiciones normales, en la que se observaba la pérdida total de señal con solo un 10% de metanol. De hecho, se llegó a introducir disoluciones con un 80% de metanol detectando señal significativa de azufre sin que el plasma se extinguiera.



**Figura 55.** Estudio de la variación de la sensibilidad con el aumento el porcentaje de metanol introducido en el Aridus II

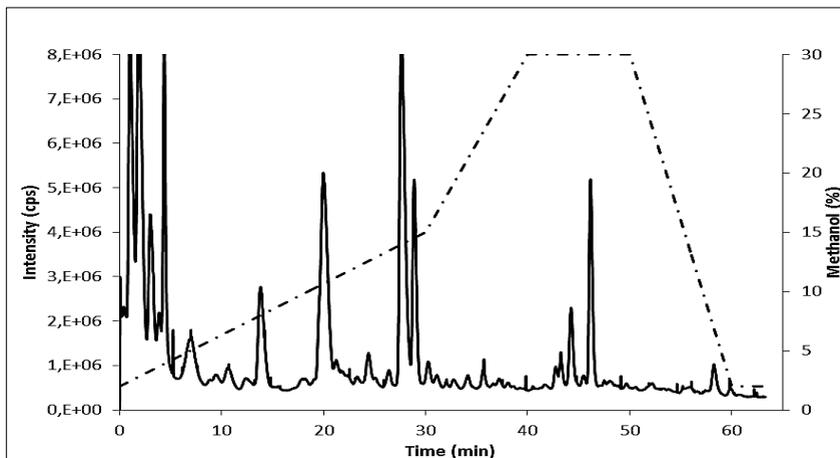
A continuación se procedió a acoplar el equipo de desolvatación Aridus II con el sistema cromatográfico. Para ello, se tuvo que reducir el flujo de la fase móvil de 200 a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  ya que éste era el flujo máximo al que podía trabajar el sistema de desolvatación.

Se ensayaron diversos gradientes siendo el que figura en la Tabla 19 con el que se obtuvieron los mejores perfiles cromatográficos para las muestras de orina de rata.

Tiempo (min)	Fase móvil A: % acetato de amonio 75 mM, pH 7,4, 2% metanol	Fase móvil B: % acetato de amonio 75 mM, pH 7,4, 30% metanol
0	100	0
2	100	0
30	50	50
40	0	100
50	0	100
60	100	0

**Tabla 19.** Gradiente utilizado con columna Discovery BIO Wide Pore C18 y fase móvil de acetato de amonio

Como se puede observar en la Figura 56 hay una clara mejora tanto en resolución como en sensibilidad con respecto a los cromatogramas obtenidos en los experimentos anteriores. En consecuencia, este fue el sistema de separación finalmente seleccionado para los estudios posteriores con animales.



*Figura 56. Cromatograma de muestra de orina de rata con gradiente de metanol utilizando el Aridus II como equipo de desolvatación/nebulización*

### **5.3- Evaluación y comparativa de equipos ICP-MS para la detección de azufre en estudios metabólicos**

Una vez puesto a punto el sistema de separación cromatográfico, se procedió a realizar un estudio comparativo sobre las prestaciones analíticas de 2 equipos de ICP-MS de doble enfoque para medir relaciones isotópicas de azufre. Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- ICP-MS de doble enfoque (Thermo Scientific Element II)
- ICP-MS multicolector (Thermo Scientific Neptune Plus)

En esta comparativa se puso especial interés en la precisión de la medida de relaciones isotópicas de azufre dado que los estudios con animales exigirán una elevada precisión con objeto de poder detectar pequeñas variaciones isotópicas entre las distintas poblaciones en estudio. Además, también se evaluaron los límites de detección de cada equipo para la medida del azufre. Por último, se acopló el sistema cromatográfico de HPLC para estudiar el comportamiento de los mismos en la medida de señales transientes.

### **5.3.1- Configuración del equipo Multicolector ICP-MS**

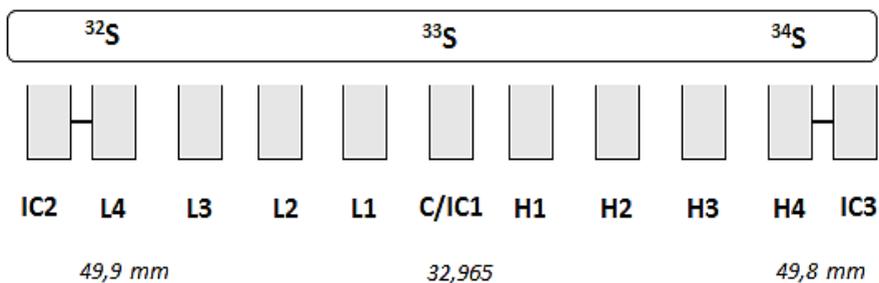
Se procedió, en primer lugar, a la configuración y optimización del equipo ICP-MS multicolector (Neptune Plus) para la detección simultánea de los isótopos de azufre. Este equipo tiene dos tipos de detectores: 9 copas de Faraday y 3 multiplicadores de electrones secundarios (SEM).

#### **Detección con copas de Faraday**

De las 9 copas de Faraday, una copa la posición central (C), mientras que 4 están situadas en la parte superior o “high” (H1-H4) y otras 4 están alojadas en la parte inferior o “low” (L1-L4). La copa central está situada en un punto fijo, mientras que el resto de copas pueden moverse y situarse en el lugar adecuado para recolectar los haces de iones correspondientes. Las copas H y L poseen motores mecánicos que hacen que sus posiciones puedan ser variadas con respecto a la copa central dentro de unos límites determinados.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

En nuestro caso, se monitorizó el isótopo  $^{33}\text{S}$  en la copa central, el isótopo  $^{34}\text{S}$  en la copa H4 y el isótopo  $^{32}\text{S}$  en la copa L4 (Figura 60). La copa central se fijó a una masa de 32,965 y las copas L4 y H4 se colocaron a una distancia de 49,9 y 49,8 mm de la copa central respectivamente (Figura 57).

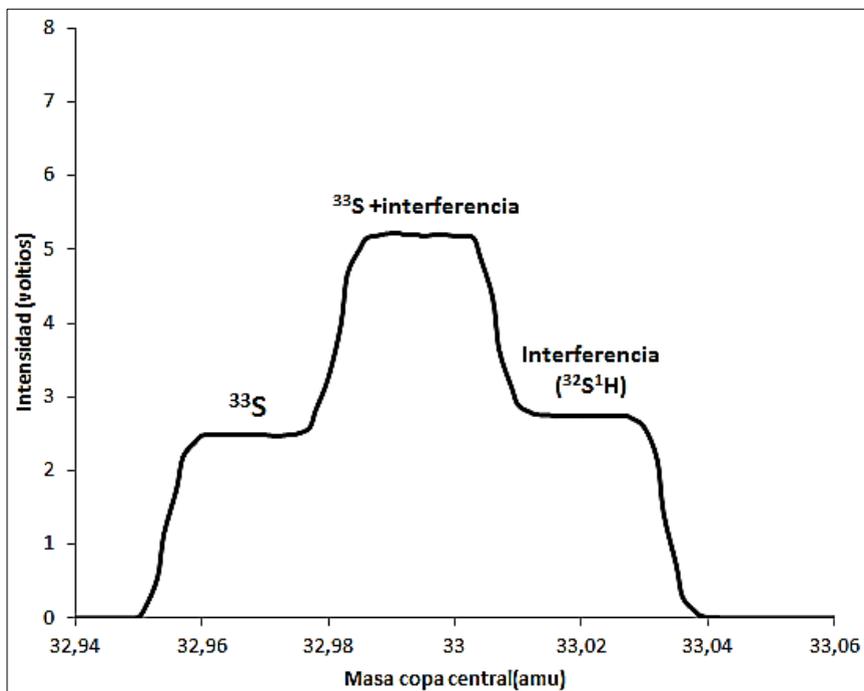


**Figura 57.** Esquema de la medida de isótopos de azufre en las copas de Faraday

El principal problema en la colocación de las copas era la baja abundancia natural de los isótopos  $^{33}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}$  del azufre. Para solucionar este problema se preparó una disolución equimolar de los 3 isótopos de azufre. De esta manera, al tener una abundancia similar para los 3 isótopos de azufre ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}$ ) nos asegurábamos de que las señales detectadas por las copas de Faraday eran realmente debido a los isótopos de azufre y no a las interferencias que los acompañan.

Por otro lado, cabe destacar que el equipo multicolector no era capaz de separar completamente los isótopos de azufre de las interferencias a pesar de trabajar en media resolución. Para los 3 isótopos de azufre se obtenían los denominados picos de “pseudo-alta” resolución, donde en un mismo pico se apreciaba una primera meseta inicial correspondiente

al isótopo de interés, seguido de otra meseta que correspondería con la suma de la señal del isótopo y la señal de la interferencia, y finalmente una tercera meseta que correspondería con la interferencia molecular para dicho isótopo. Un ejemplo de este tipo de picos se puede observar en la Figura 58 para el isótopo  $^{33}\text{S}$  del azufre.



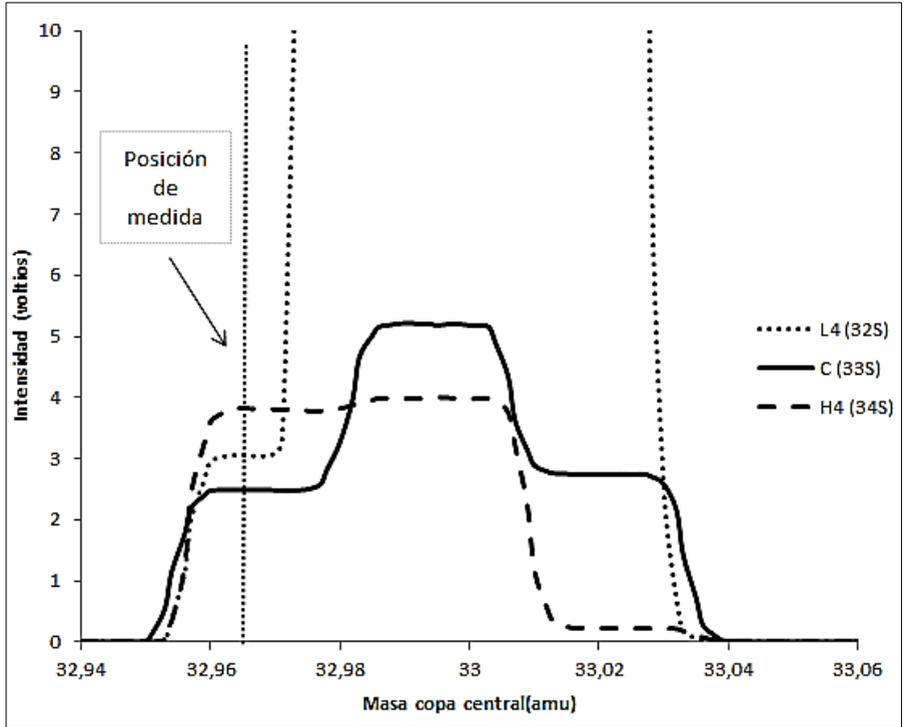
**Figura 58.** Pico de “pseudo-alta” resolución para el  $^{33}\text{S}$

Las señales de las interferencias se situaban siempre a una relación  $m/z$  por encima de la del isótopo de azufre de modo que el voltaje del imán debía ser fijado de tal manera que la primera meseta de interés, correspondiente a los isótopos de azufre, pudiera ser medida.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

---

A la hora de visualizar los espectros para los 3 isótopos de azufre ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}$ ) el equipo los mostraba en función de la masa de la copa central, que es el valor que sirve para fijar el voltaje ofrecido por el imán. A pesar de que cada haz de iones llegaba a su correspondiente copa de Faraday, todos los espectros se representan superpuestos (Figura 59). De esta forma, además de optimizar la forma de los picos de “pseudo-alta” resolución para que la primera meseta fuera lo más ancha posible, también había que asegurarse que las mesetas de los 3 isótopos estuvieran alineadas. El valor que se fijaba en la masa central, en este caso 32,965, era donde el equipo iba a medir la señal del isótopo 33 del azufre. Para medir los isótopos 32 y 34 se mueven las posiciones de las copas de Faraday H4 Y L4, respectivamente, hasta que los 3 espectros aparecen superpuestos.



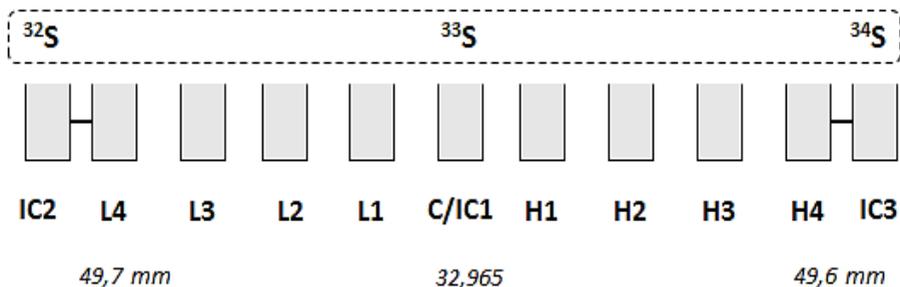
**Figura 59.** Espectro de masas obtenido utilizando las copas de Faraday con una disolución equimolar de 5  $\mu\text{g/g}$

Para la superposición de los espectros se partía de una configuración inicial de las copas de Faraday que debía ser ajustada diariamente. En este caso, tanto el valor de la masa de la copa central (C), como la distancia de las copas H4 y L4 respecto a la copa central debían ser optimizadas. Además, también se podía optimizar la configuración de las lentes para terminar el proceso de superposición.

### **Multiplicadores de electrones secundarios (Ion Counters)**

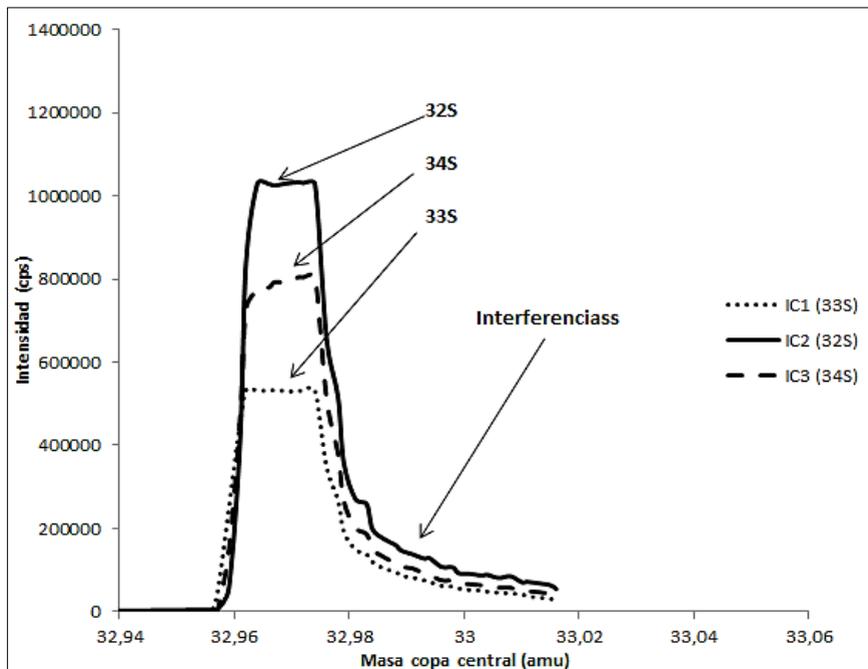
Como se ha comentado, el equipo posee 3 SEM. El primero de estos detectores (IC1) se encuentra junto a la copa central, y, por tanto, fijo en la misma posición. El segundo SEM se encuentra unido a la copa de Faraday L4, mientras que el tercer SEM se encuentra unido a la copa de Faraday H4. Para la configuración de estos detectores es necesario mover las copas de Faraday, ya que son éstas las que poseen los motores mecánicos.

Se monitorizaron los 3 isótopos principales de azufre situando los detectores de tal manera que los haces de iones llegasen a las posiciones correctas. En el IC1 se monitorizó el isótopo 33, en el IC2 el isótopo 34 y en el IC3 el isótopo 32 (Figura 60). En este caso, la copa central se fijó a una masa de 32,965 y las copas L4 y H4 se colocaron a una distancia de 49,7 y 49,6 mm de la copa central respectivamente.



**Figura 60.** Esquema de la medida de isótopos de azufre en los “Ion Counters”

Este tipo de detectores, al igual que sucedía para las copas de Faraday, deben ser correctamente posicionados para poder medir los isótopos de azufre y no las interferencias que las acompañan. Además, los SEM poseen un sistema de protección que hace que dejen de contabilizar los iones que les llegan si superan aproximadamente las  $1 \times 10^6$  cps. Este hecho hace aún más difícil su configuración ya que las señales de las interferencias de los isótopos de azufre, fundamentalmente los iones moleculares de  $O_2$ , son muy elevados. El uso de la disolución equimolar de los 3 isótopos de azufre es totalmente necesario para optimizar las posiciones de los detectores. El rango de masas para la monitorización de cada uno de los 3 isótopos de azufre es muy pequeño, debido a que las interferencias superan el límite máximo de cps y los detectores se protegen de modo que solo se puede observar en el espectro las estrechas mesetas correspondientes a las señales de los isótopos de azufre(Figura 61).



**Figura 61.** Espectro de masas obtenido utilizando los SEM con una disolución de azufre equimolar de 100 ng/g (obsérvese que la señal debido a los interferentes no aparece ya que los SEM se protegen dejando de medir)

Al igual que sucedía con las copas de Faraday, una vez fijado el espectro del isótopo 33 en el IC1, se mueven las posiciones de los detectores IC2 e IC3 hasta que los espectros para los isótopos 32 y 34 aparecen superpuestos en la imagen, lo que indica que el equipo está midiendo en los 3 casos en las mesetas correspondientes a los isótopos de azufre.

### **5.3.2- Rango lineal, blancos y límites de detección**

Se estudió el rango lineal en los equipos ICP-MS midiendo disoluciones estándar de concentración creciente desde 0 hasta 10 µg/g.

En el equipo multicolector ICP-MS se observó que los detectores SEM solo podían ser utilizados hasta una concentración de 100 ng/g debido al sistema de protección que poseen. Concentraciones más elevadas de azufre dan lugar a señales que provocan la automática protección de los detectores. Las copas de Faraday, sin embargo, poseían un mayor rango de trabajo pudiendo medir concentraciones de hasta 10 µg/g.

En el equipo ICP-MS de doble enfoque el rango de trabajo era el mismo que para las copas de Faraday.

Los límites de detección instrumental fueron calculado utilizando el criterio de 3 veces la desviación estándar del blanco dividido por la pendiente de la recta de calibrado de los isótopos correspondientes. En este caso se hallaron los límites de detección para el  $^{32}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}$ .

Los valores de los límites de detección obtenidos para los 2 equipos ICP-MS trabajando a media resolución ( $\Delta m/m = 3.000$ ) se recogen en la Tabla 20.

Equipo	LOD <sup>32</sup> S (ppb)	LOD <sup>34</sup> S (ppb)
ICP-MS doble enfoque	1,8	2
ICP-MS multicolector (copas de Faraday)	1,4	0,2
ICP-MS multicolector (Ion Counters)	2	0,05

**Tabla 20.** LOD para los 2 equipos ICP-MS

### **5.3.3- Medida de relaciones isotópicas de azufre**

#### **Exactitud en la medida de relaciones isotópicas**

Se estudió el efecto de la discriminación de masas en los equipos ICP-MS de doble enfoque y el equipo multicolector con copas de Faraday. En los equipos ICP-MS los isótopos más pesados son transmitidos con mayor eficiencia respecto a los más ligeros, haciendo que la relación isotópica medida se desvíe de la real tanto más cuanto mayor sea la diferencia entre los isótopos medidos.

Para la corrección de este efecto en la medida de las relaciones isotópicas de azufre se evaluaron 3 ajustes teóricos.

Ajuste lineal:

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{medida}}}{1 + F\Delta m} \quad (23)$$

Ajuste exponencial:

$$R_{\text{corregida}} = R_{\text{medida}} \exp(F \Delta m) \quad (24)$$

Ajuste potencial:

$$R_{\text{corregida}} = R_{\text{medida}} (1 + F)^{\Delta m} \quad (25)$$

Siendo:

- $R_{\text{medida}}$ : Relación isotópica medida
- F: Factor de corrección
- $\Delta m$ : Diferencia de masa entre isótopos
- $R_{\text{corregida}}$ : Relación isotópica corregida

Para estudiar la discriminación de masas se utilizaron disoluciones patrón de azufre de abundancia natural. A continuación se presentan los resultados obtenidos al aplicar los ajustes teóricos citados en el equipo DF-ICP-MS (Tabla 21) y en el equipo MC-ICP-MS (Tabla 22).

<b>Ajuste lineal</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	7,5	0,0
1	2,4	-1,3
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,03772		
<b>Ajuste exponencial</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	7,5	0,0
1	2,5	-1,2
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,03636		
<b>Ajuste potencial</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	7,5	0,0
1	2,5	-1,2
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,03703		

**Tabla 21.** Valores obtenidos para la corrección de masas mediante los 3 ajustes teóricos para el DF- ICP-MS

<b>Ajuste lineal</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	9,3	0,0
1	4,06	-0,6
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,04643		
<b>Ajuste exponencial</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	9,3	0,0
1	4,06	-0,5
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,04440		
<b>Ajuste potencial</b>		
<i>Diferencia de masa</i>	$(R_{exp} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$	$(R_{corr} - R_{teo})/R_{teo} \times 100$
2	9,3	0,0
1	4,06	-0,5
0	0,0	0,0
Factor de corrección(F) = 0,04540		

**Tabla 22.** Valores obtenidos para la corrección de masas mediante los 3 ajustes teóricos para el MC- ICP-MS

Como se puede observar en ambos equipos, tanto el ajuste exponencial como el ajuste potencial ofrecían los mejores resultados en la corrección de las relaciones isotópicas de azufre. En nuestro grupo de

investigación se ha optado históricamente por la corrección exponencial, por lo que al ofrecer resultados similares fue el ajuste elegido para la corrección de relaciones isotópicas en los experimentos.

### **Precisiones en la medida de relaciones isotópicas**

Para evaluar la precisión de las medidas de relaciones isotópicas se midieron las señales para diferentes niveles de concentración utilizando disoluciones estándar de azufre de abundancia natural. El rango de concentraciones evaluado se encontraba dentro del rango lineal de trabajo de cada equipo. Los resultados se expresaron como el coeficiente de variación en la medida de las relaciones isotópicas  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  y  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$ . Los parámetros instrumentales utilizados en cada equipo ICP-MS se recogen en la Tabla 23.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

Parámetros	DF-ICP-MS	MC-ICP-MS (copas de Faraday)	MC-ICP-MS (SEM)
Potencia Rf	1350 W	1200W	1200W
Flujo gas plasmógeno	14 L min <sup>-1</sup> Ar	14 L min <sup>-1</sup> Ar	14 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas auxiliar	0,95 L min <sup>-1</sup> Ar	0,9 L min <sup>-1</sup> Ar	0,9 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas nebulizador	0,91L min <sup>-1</sup> Ar	0,89 L min <sup>-1</sup> Ar	0,89 L min <sup>-1</sup> Ar
Resolución	Media (~3000)	Media (~3000)	Media (~3000)
Método de adquisición	5 "runs", 200 "passes", 0,01 s tiempo muestreo, 10 puntos por pico 3 s tiempo muestra	5 bloques, 10 ciclos, 4,194 s tiempo integración, 3 s tiempo muestra	5 bloques, 10 ciclos, 4,194 s tiempo integración, 3 s tiempo muestra
Configuración de copas		L4 <sup>32</sup> S C <sup>33</sup> S H4 <sup>34</sup> S	IC2 <sup>32</sup> S IC1 <sup>33</sup> S IC3 <sup>34</sup> S

**Tabla 23.** Parámetros instrumentales de los equipos ICP-MS para la medida de relaciones isotópicas

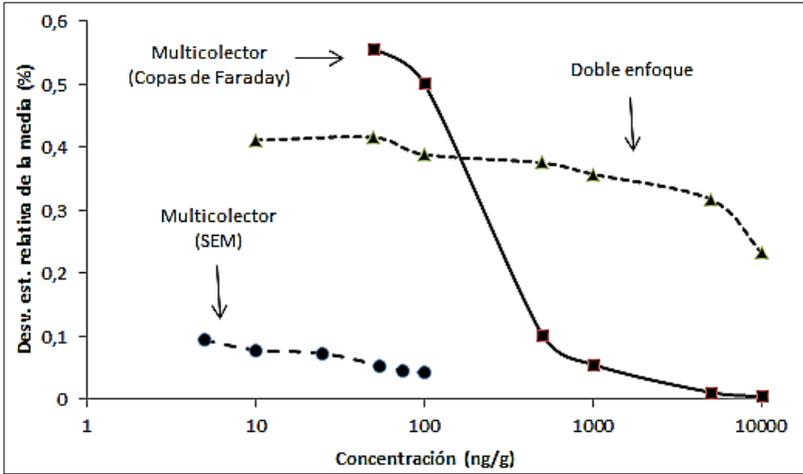
## 5- Desarrollo de una metodología analítica

---

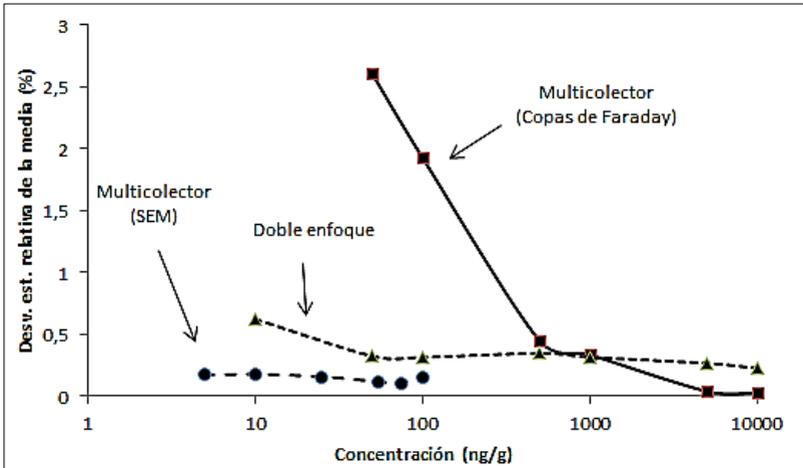
En las figuras 62 y 63 se muestra la precisión obtenida en la medida de las relaciones  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  y  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$  para los 2 equipos evaluados respectivamente. Los SEM fueron evaluados para su rango de linealidad, entre 0-100 ng/g, mientras que el resto de detectores fueron evaluados en un rango de 0-10 µg/g.

Como se puede observar, el equipo multicolector ICP-MS fue el que mejores precisiones obtuvo para la medida de relaciones isotópicas de azufre con ambos tipos de detectores. Para los SEM se obtuvieron precisiones por debajo del 0,1% incluso para concentraciones muy bajas de azufre (<100 ng/g), mientras que en las copas de Faraday se alcanzaron precisiones por debajo del 0,01% para concentraciones elevadas de azufre (> 5 µg/g).

En el equipo ICP-MS de doble enfoque se obtuvieron precisiones notablemente peores con respecto al equipo multicolector.



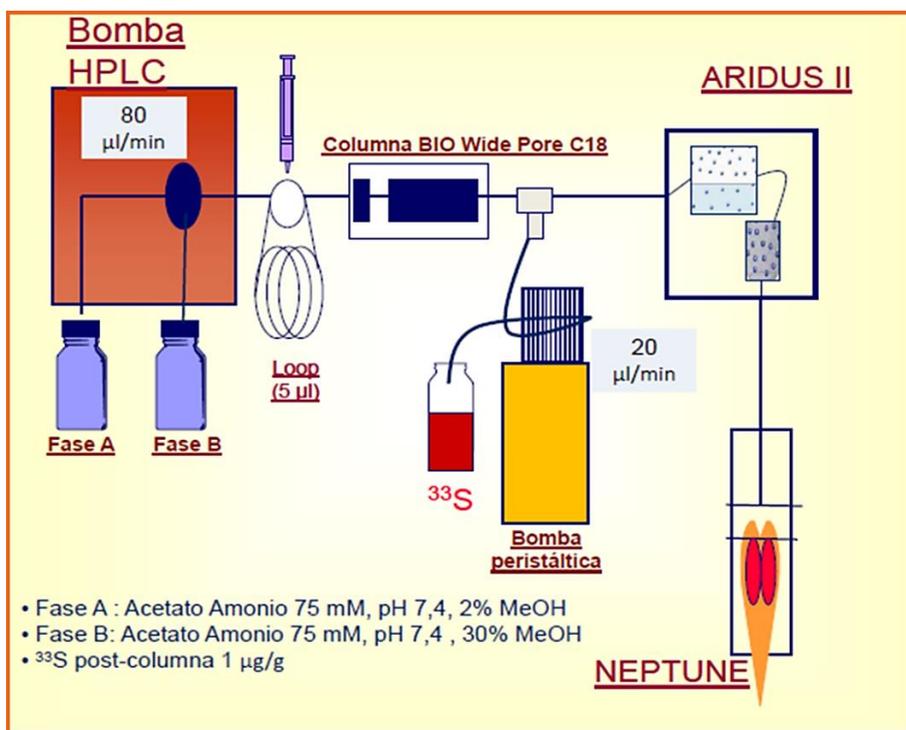
**Figura 62.** Precisión obtenida en la medida de la relación isotópica  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  para los equipos ICP-MS evaluados



**Figura 63.** Precisión obtenida en la medida de la relación isotópica  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$  para los equipos ICP-MS evaluados

## 5.4- Método de cuantificación de los metabolitos de azufre en la orina

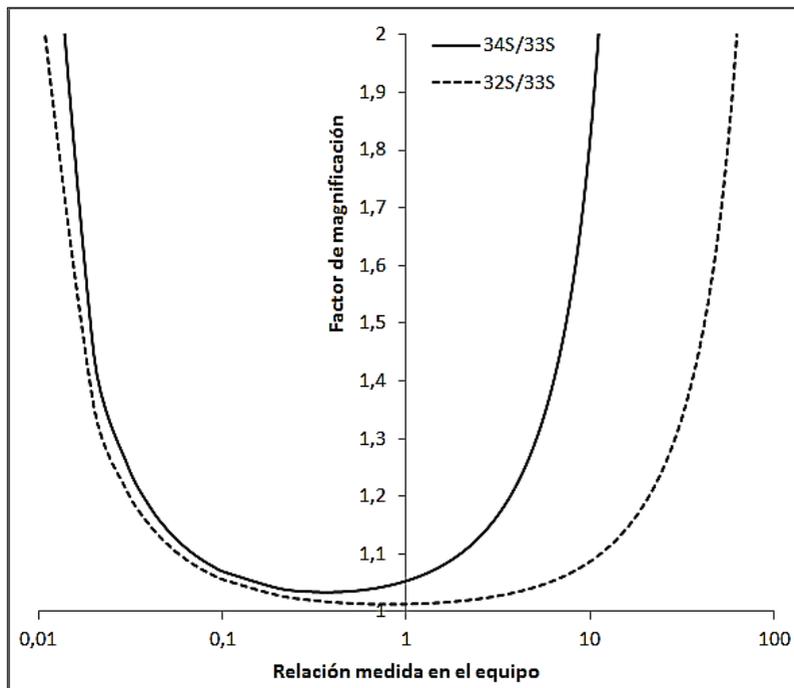
Para la cuantificación de los compuestos de azufre se utilizó la metodología de la dilución isotópica post-columna utilizando azufre  $^{33}\text{S}$  enriquecido como trazador. Para ello se introdujo un flujo post-columna constante de este isótopo tras la separación cromatográfica de los analitos de azufre (Figura 64).



**Figura 64.** Esquema de la metodología desarrollada para los estudios metabólicos de azufre

El flujo post-columna estaba limitado por el flujo máximo de trabajo del equipo de desolvatación. Este flujo máximo de entrada al Aridus II era de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Dado que tanto el flujo de la columna como el flujo post-columna debían pasar a través del sistema de desolvatación se decidió que el flujo post-columna fuera de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mientras que el flujo que pasaba a través de la columna fuera de 80  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

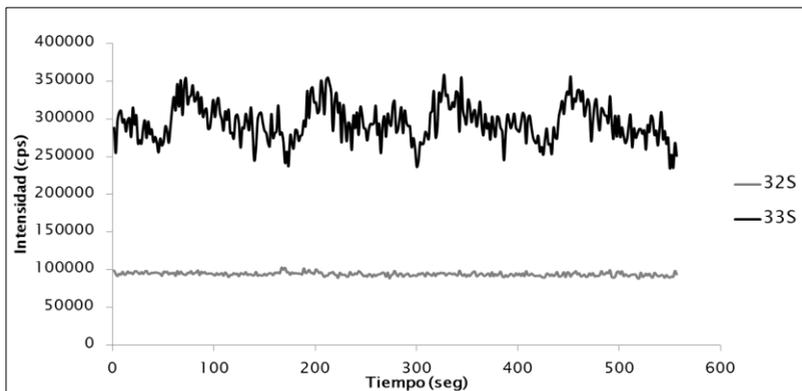
Se evaluó la concentración de la disolución trazador de azufre  $^{33}\text{S}$  post-columna que se iba a utilizar. Para ello, se utilizó la ecuación del factor de magnificación [191] que permite calcular el incremento que se producirá en la incertidumbre de la concentración calculada utilizando la ecuación de la dilución isotópica en función de la relación isotópica medida en el equipo. Como se puede observar en la Figura 65, la relaciones  $^{32}\text{S}/^{33}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}/^{33}\text{S}$  óptimas se encontraban entre 0,1-10. Se calculó que una disolución de 1  $\mu\text{g}/\text{g}$  nos permitía situarnos en ese margen de 0,1-10 para la relaciones  $^{32}\text{S}/^{33}\text{S}$  y  $^{34}\text{S}/^{33}\text{S}$  en la mayoría de los picos cromatográficos de la muestra de orina.



**Figura 65.** Factor de magnificación utilizando  $^{33}\text{S}$  como trazador

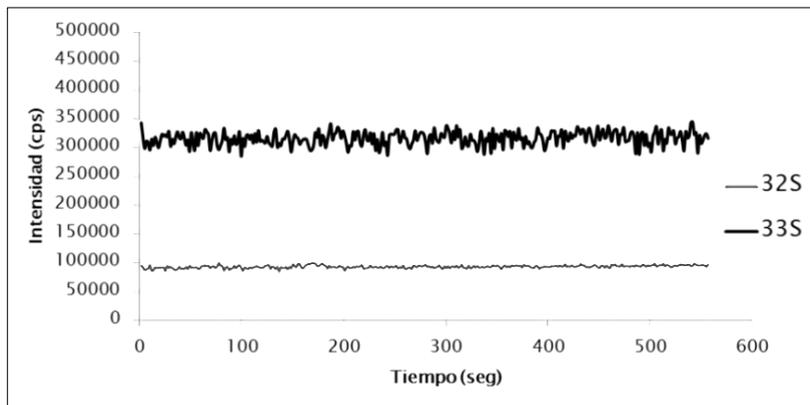
Para la introducción del isótopo enriquecido post-columna se ensayaron distintas opciones de sistema de bombeo buscando aquella que ofrecía una mejor relación señal-ruido.

Se ensayó un sistema de bombeo por desplazamiento que contenía un reservorio de 10 mL empujado por un embolo que se mueve por medio de un motor de paso a paso. Se observó que el ruido producido por el movimiento del tornillo que empujaba al émbolo era relativamente alto. Además, la cantidad de disolución que podía contener la cámara era limitada y no permitía completar los cromatogramas.



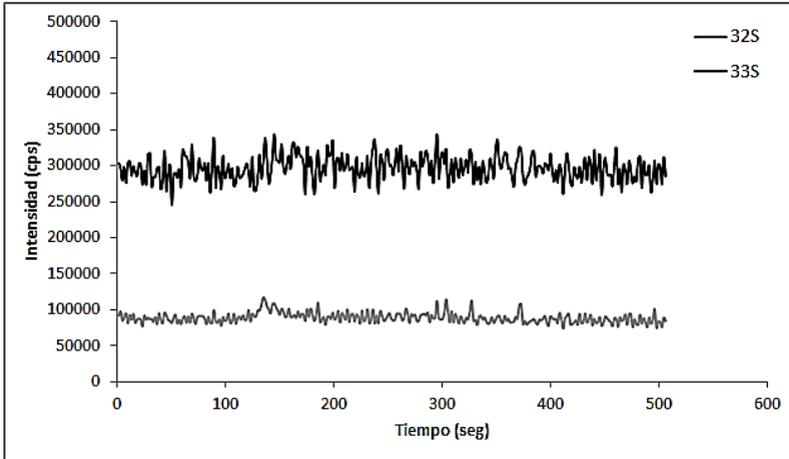
**Figura 66.** Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba de jeringa (patrón de azufre 33 de  $1\ \mu\text{g/g}$ )

Por ello, se probó otra bomba de desplazamiento con dos cámaras de 10 mL de volumen y dos pistones que empujan secuencialmente las disoluciones de dichas cámaras. Como se puede observar en la Figura 67 el ruido producido por este sistema de bombeo es sensiblemente menor. Desafortunadamente, cuando uno de las cámaras se vacía, la bomba cambia automáticamente a la otra cámara produciendo una momentánea pérdida de la señal. Como el volumen de las cámaras no era suficiente para completar un cromatograma, se decidió ensayar otros tipos de sistemas de bombeo.



**Figura 67.** Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba de doble pistón (patrón de azufre 33 de  $1\ \mu\text{g/g}$ )

Se optó finalmente por probar un sistema de bombeo mediante bomba peristáltica. Como se puede observar en la Figura 68 el ruido era un poco mayor que para el caso del sistema de bombeo con dos pistones pero sensiblemente mejor que para el caso en el que se utilizaba un mecanismo de tornillo accionado por motor a paso. Dada la mayor facilidad de manejo a la hora de introducir el spike post-columna se optó por utilizar este sistema.



**Figura 68.** Flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  introducido con una bomba peristáltica (patrón de azufre 33 de  $1\ \mu\text{g/g}$ )

Una vez establecido el sistema de bombeo a utilizar para la introducción post-columna de la disolución enriquecida de azufre 33, se procedió a acoplar todo el sistema cromatográfico para estudiar los cromatogramas de orina de rata.

Los parámetros del equipo MC-ICP-MS y las condiciones cromatográficas de HPLC, así como las del sistema de nebulización, se recogen en la Tabla 24. Estas condiciones son las que van a ser utilizadas en todos los experimentos realizados con animales de laboratorio.

## 5- Desarrollo de una metodología analítica

---

### Parámetros MC-ICP-MS

---

Potencia Rf	1.200 W
Flujo gas plasmógeno	14 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo "gas auxiliar	0,9 L min <sup>-1</sup> Ar
Flujo gas nebulizador	0,89 L min <sup>-1</sup> Ar
Resolución	Media (~3000)
Método de adquisición	5 bloques, 10 ciclos, 4,194 s tiempo instrumental, 3 s tiempo medida
Modo detección	Copas de Faraday
Isótopos medidos	<sup>32</sup> S, <sup>33</sup> S, <sup>34</sup> S
Configuración copas de Faraday	
	L4 <sup>32</sup> S
	C <sup>33</sup> S
	H4 <sup>34</sup> S

---

### Condiciones HPLC

---

Columna	Discovery BIO Wide Pore C18
Loop inyección	5 µL
Flujo	80 µL/min

Fases móviles	A ) Acetato de amonio 75 mM, pH 7,4 , 2% MeOH B) Acetato de amonio 75 mM, pH 7,4, 30% MeOH
Gradiente	2 min 100% A, 30 min 50% A, 40 min 100% B, 50 min 100% B, 60 min 100% A
Flujo Post-column	20 $\mu$ L/min

---

**Condiciones sistema desolvatación (Aridus II)**

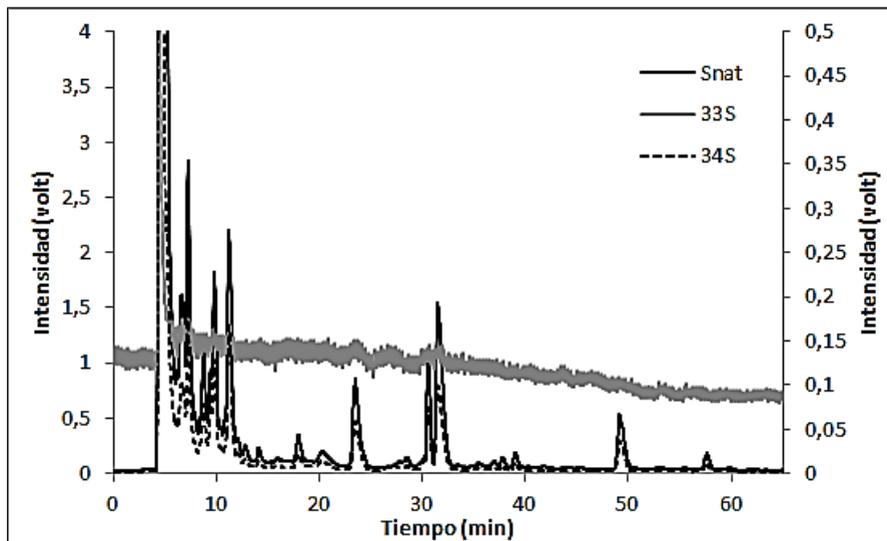
---

Flujo gas nebulizador	0,9 L.min <sup>-1</sup>
Flujo "sweep" gas	0,5 L.min <sup>-1</sup>
Temperatura cámara nebulización PFA	110°C
Temperatura membrana desolvadora	160°C

---

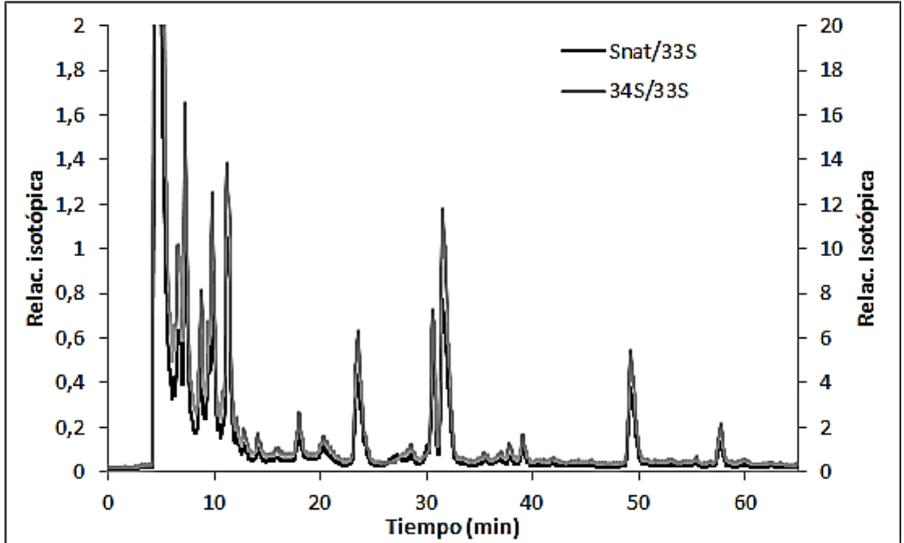
**Tabla 24.** *Parámetros instrumentales y condiciones cromatográficas para los estudios con animales de laboratorio*

Un cromatograma típico para una muestra de orina de rata a la que se había suministrado una dosis de levadura enriquecida en <sup>34</sup>S se muestra en la Figura 69.



**Figura 69.** Cromatograma de orina de rata con flujo post-columna de  $^{33}\text{S}$  (señal de  $^{nat}\text{S}$  eje de ordenadas de la izquierda y señal de  $^{33}\text{S}$  eje de ordenadas de la derecha)

Para evaluar el grado de enriquecimiento en los metabolitos de azufre en la orina es necesario convertir este cromatograma de intensidades en un cromatograma de flujo molar relativo. Para ello, se dividen las intensidades en cada punto para obtener las relaciones isotópicas, las cuales se corrigen teniendo en cuenta el factor de discriminación de masas (Figura 70).



**Figura 70.** Cromatograma de relaciones isotópicas (relación  $^{nat}S/^{33}S$  eje de ordenadas de la izquierda y señal de  $^{34}S/^{33}S$  eje de ordenadas de la derecha)

A continuación, se obtienen las abundancias isotópicas en cada punto utilizando las siguientes expresiones:

$$A_{32} = \frac{R_{\frac{32}{33}}}{1 + R_{\frac{32}{33}} + R_{\frac{34}{33}}} \quad (26)$$

$$A_{33} = \frac{1}{1 + R_{\frac{32}{33}} + R_{\frac{34}{33}}} \quad (27)$$

$$A_{34} = \frac{R_{34}}{1 + \frac{R_{32}}{33} + \frac{R_{34}}{33}} \quad (28)$$

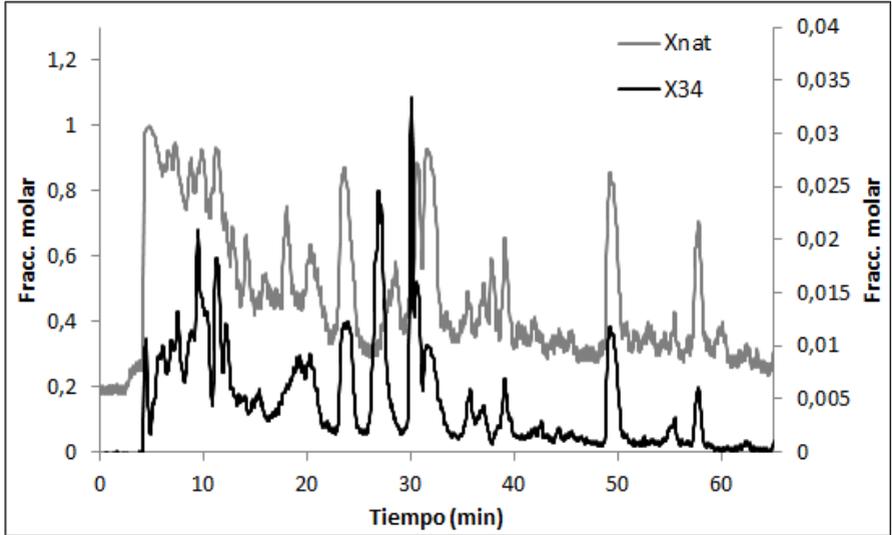
A partir de las abundancias, se calcula en cada punto las fracciones molares del azufre natural, el azufre enriquecido en el isótopo 33 y el azufre enriquecido en el isótopo 34 utilizando la siguiente ecuación:

$$\begin{bmatrix} A_{32} \\ A_{33} \\ A_{34} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,9493 & 0,0001 & 0,0021 \\ 0,0076 & 0,9970 & 0,0042 \\ 0,0429 & 0,0029 & 0,9937 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{33} \\ x_{34} \end{bmatrix} \quad (29)$$

Los valores numéricos corresponden a la composición isotópica del azufre natural (primera columna), azufre 33 enriquecido (segunda columna) y al azufre 34 enriquecido (primera columna). Las incógnitas son las fracciones molares del azufre natural y del azufre 33 y 34 provenientes de las disoluciones enriquecidas en dichos isótopos. El cromatograma de fracciones molares se representa en la Figura 71.

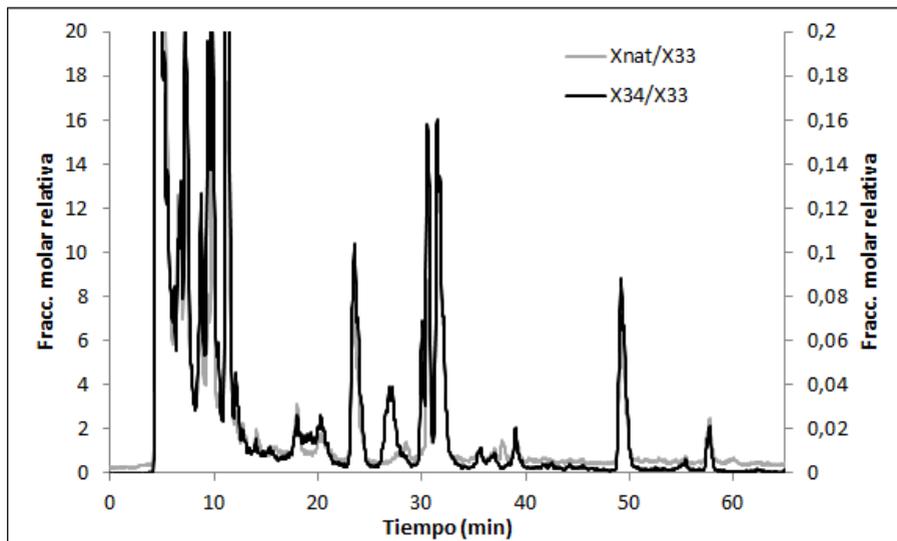
A lo largo de la presente Tesis Doctoral, para simplificar los términos, se utilizará la siguiente nomenclatura:

- $X_{nat}$ : fracción molar de azufre 32 de origen natural
- $X_{33}$ : fracción molar de azufre 33 procedente de la disolución enriquecida como dicho isótopo añadida como trazador post-columna
- $X_{34}$ : fracción molar de azufre 34 procedente de la levadura enriquecida en dicho isótopo



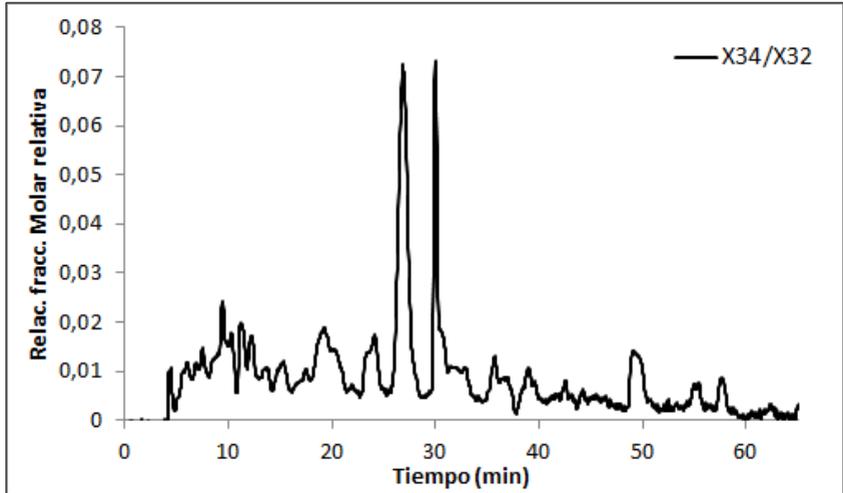
**Figura 71.** Cromatograma de fracciones molares (fracción molar  $X_{nat}$  eje de ordenadas de la izquierda y fracción molar  $X_{34}$  eje de ordenadas de la derecha)

Seguidamente, se puede obtener el cromatograma de flujo molar relativo dividiendo la fracción molar del azufre natural o del azufre 34 enriquecido entre la fracción molar del azufre 33 enriquecido (Figura 72).



**Figura 72.** Cromatograma de fracciones molares relativas (fracción molar relativa  $X_{nat}/X_{33}$  eje de ordenadas de la izquierda y fracción molar relativa  $X_{34}/X_{33}$  eje de ordenadas de la derecha)

Finalmente, se puede representar el cromatograma correspondiente al cociente de la fracción molar de azufre 34 enriquecido entre la fracción molar de azufre natural, que nos indicaría el grado de enriquecimiento en cada compuesto (Figura 73).



**Figura 73.** Cromatograma de grado de enriquecimiento en  $^{34}\text{S}$

## **5.5- Conclusiones**

1- Se ha puesto a punto un método para la separación de los metabolitos de orina de rata Wistar. Dicho método incluye una separación de HPLC de fase reversa en régimen de gradiente obteniendo más de 20 picos cromatográficos si bien la mayoría de ellos no identificados al no corresponderse los tiempos de retención con los de los patrones disponibles.

2- Aun desconociendo la naturaleza de los compuestos separados, la adición de un flujo de azufre enriquecido en  $^{33}\text{S}$  a la salida de la columna cromatográfica permite utilizar un método de IPD para la cuantificación del azufre natural o enriquecida en  $^{34}\text{S}$  presente en cada pico cromatográfico.

3- El sistema de desolvatación/nebulización Aridus II permite eliminar en buena medida el disolvente orgánico utilizado en la fase móvil (en nuestro caso hasta un 30%) evitando que el mismo alcance el plasma lo que ocasionaría una disminución de la sensibilidad analítica del equipo a medida que aumenta la concentración de metanol e incluso la eventual extinción del plasma.

4- De los 2 equipos de ICP-MS evaluados (Element II y Neptune Plus) el que ofrece mejores prestaciones analíticas, especialmente en la precisión de la medida de relaciones isotópicas de azufre, es el equipo multicolector utilizando las copas de Faraday como sistema de detección, ya que si bien los SEM presentaban excelentes precisiones en la medida de relaciones isotópicas de azufre a concentraciones por debajo de 100 ppb, por encima de esta concentración el sistema de autoprotección de estos detectores en el equipo imposibilitaba la

utilización de los mismos en muestras reales, donde la concentración de azufre es del orden de las partes por millón.



---

**6- Evaluación del  
enriquecimiento  
isotópico de azufre en  
orina de animales de  
laboratorio tras  
suministrarles una dosis  
de levadura enriquecida**



## **6.1- Experimentos con ratas Wistar**

Los experimentos con animales se llevaron a cabo en el Bioterio de la Universidad de Oviedo siguiendo las directrices correspondientes a la protección de animales para propósitos científicos (86/609/EEC).

En estos estudios se administró una cantidad conocida de levadura enriquecida en azufre 34 a animales de laboratorio para estudiar la incorporación de ese azufre en los metabolitos excretados en la orina. Las muestras de orina fueron analizadas de acuerdo con la metodología previamente desarrollada (ver apartado 5.4).

En estos primeros estudios se utilizó el stock de levadura enriquecida en azufre 34 en un 70% y que se había sintetizado en nuestro laboratorio con anterioridad a la realización de esta Tesis Doctoral.

Los animales de laboratorio utilizados en estos primeros experimentos fueron ratas Wistar. A cada individuo se le administraba una cantidad de levadura enriquecida en azufre 34 mediante una sonda (Figura 74). De esta manera se aseguraba que todo el producto era consumido por el animal. Este método no causaba ningún daño al animal. La levadura se diluía con una pequeña cantidad de agua Mili-Q para formar una papilla y evitar así que las ratas tuviesen problemas en la ingestión de la misma.

Para obtener las muestras de orina, los animales se introducían en unas jaulas metabólicas que permitían que se pudiese recoger tanto la orina como las heces excretadas (Figura 75). En este tipo de jaulas también se podía conocer con exactitud la cantidad de comida y bebida ingerida

## 6- Experimentos con animales de laboratorio

---

por el animal, aunque en nuestro caso no eran datos relevantes y no se tuvieron en cuenta.



**Figura 74.** Administración de levadura enriquecida a una rata mediante sonda oral



**Figura 75.** Jaula metabólica especial para ratas

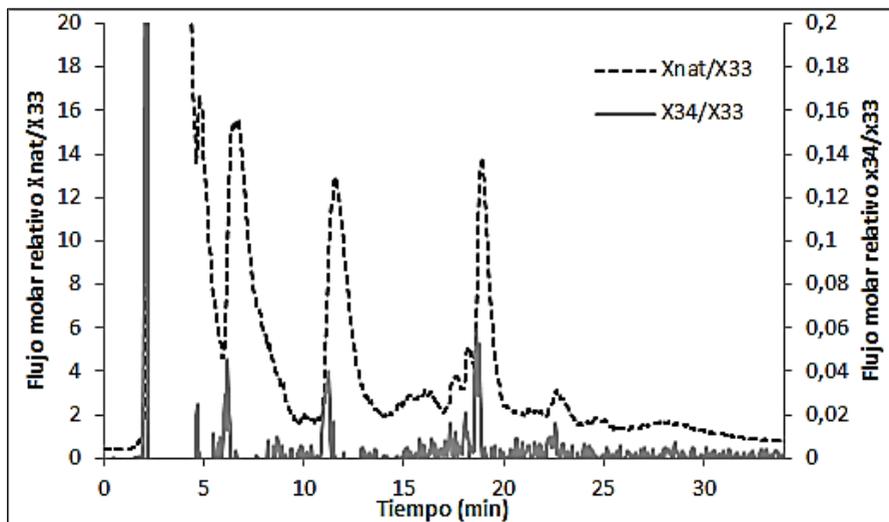
### **6.1.2- Primer experimento con ratas**

En este primer experimento se administró a una rata Wistar de 300 gramos de peso una mezcla de levadura enriquecida con agua mili-Q que contenía 1 gramo de levadura (379 µg/g azufre total y 66% enriquecimiento en <sup>34</sup>S) más 2.5 mL de agua mili-Q. En estos experimentos se utilizó el equipo de doble enfoque como sistema de detección empleando las condiciones de la Tabla 9.

Para estudiar la evolución de la marca isotópica, azufre 34, en los metabolitos de la orina se decidió realizar las tomas de muestras cada 24 horas durante 7 días, siendo la primera toma de muestra a las 6 horas.

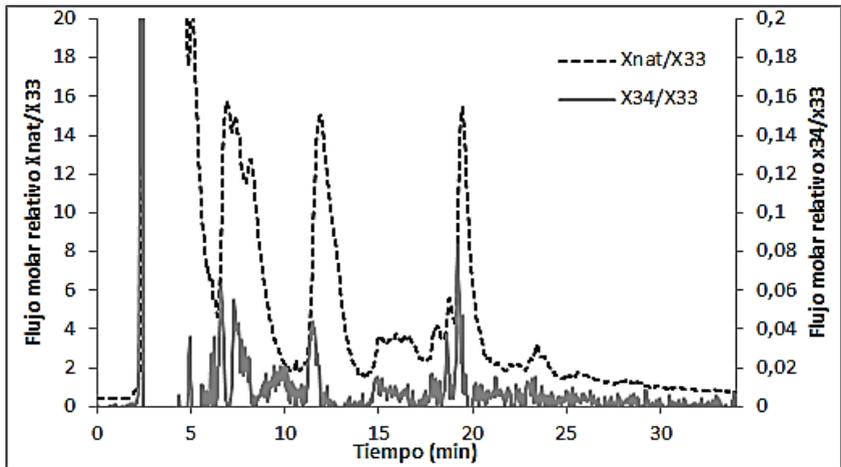
De esta manera, se realizaba un amplio seguimiento de los compuestos de azufre, ya que no sabíamos con seguridad si la marca isotópica iba a verse en un periodo de tiempo corto o largo. Las orinas se centrifugaban a alta velocidad una vez recogidas para eliminar sólidos en suspensión. Después se almacenaban a - 20°C hasta su posterior análisis.

En estos primeros estudios se pretendía solo conocer si éramos capaces de observar la marca isotópica en los animales después de la administración de la levadura. En la Figura 76 se muestra el cromatograma de flujo molar relativo para la orina control (recogida antes de la administración de la levadura).

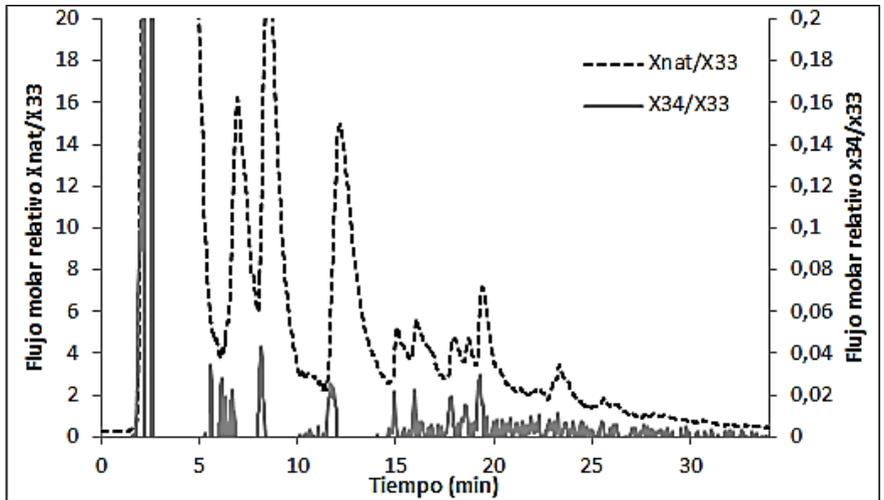


**Figura 76.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata control

En la Figura 77 se muestra la orina recogida 6 horas después de la administración de la levadura. Parece observarse que para ciertos metabolitos aparece un enriquecimiento en azufre 34, si bien esta marca es poco visible y apenas se distingue del ruido, que es muy elevado en el equipo de doble enfoque.



**Figura 77.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata a las 6 horas



**Figura 78.** *Cromatograma de flujo molar relativo para orina de rata a las 48 horas*

A partir de las 48 horas (Figura 78) se observó que este aparente enriquecimiento en azufre 34 volvía a desaparecer. Por tanto las tomas de muestras deben ser reducidas a espacios más cortos de tiempo después de la administración de la levadura.

También decidimos que había que aumentar la cantidad de levadura administrada para observar con mayor claridad la marca isotópica ya que no se apreciaba con claridad en los cromatogramas obtenidos.

### **6.1.3- Segundo experimento con ratas**

En este segundo experimento se variaron las cantidades de levadura administrada así como los tiempos de recogida de la orina. Las cantidades administradas a una rata Wistar de 300 gramos de peso fueron 5 gramos de levadura (379  $\mu\text{g/g}$  azufre total y 66% enriquecimiento en  $^{34}\text{S}$ ) diluidos en 4 mL de agua mili-Q.

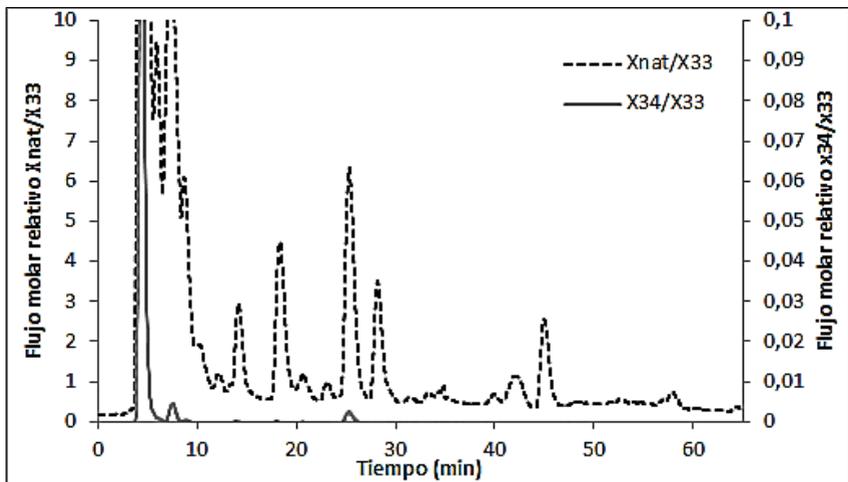
Los tiempos de recogida de la orina fueron cada 12 horas durante 48 horas, siendo la primera recogida a las 6 horas después de la administración. En este caso se utilizó el equipo multicolector ICP-MS como sistema de detección utilizando las condiciones que se recogen en la Tabla 22.

Al aumentar la cantidad de levadura administrada se obtuvo un mayor enriquecimiento en los metabolitos de azufre en la orina. En las figuras 81 a 84 se muestran los cromatogramas de flujo molar relativo obtenido

antes de administrar la levadura enriquecida (Figura 79) y una vez transcurridas 6 horas (Figura 80), 12 horas (Figura 81) y 24 horas (Figura 82) desde la administración de la levadura enriquecida.

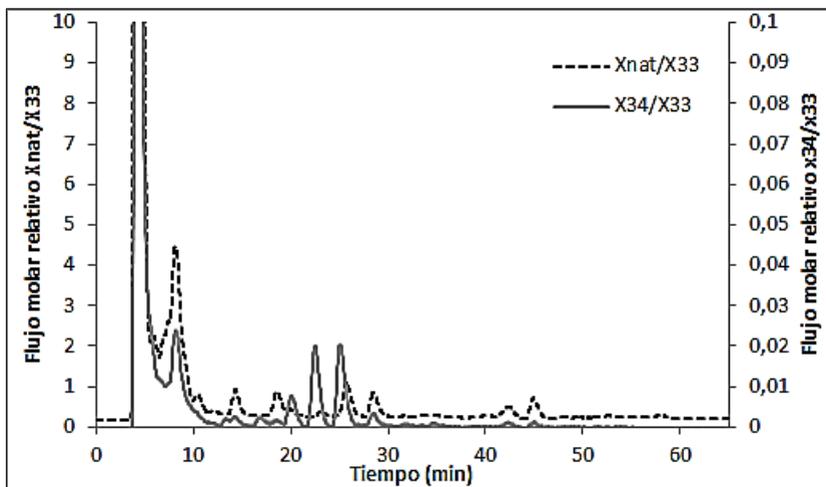
El máximo enriquecimiento se observó una vez transcurridas 12 horas desde la administración de la levadura enriquecida, observándose un alto grado de enriquecimiento para casi todos los compuestos (Figura 81). También hay que destacar que transcurridas 6 horas desde la administración del producto marcado se observa un elevado enriquecimiento en algunos metabolitos de azufre (Figura 80).

A partir de las 12 horas el enriquecimiento en azufre 34 comienza a disminuir progresivamente. En la orina recogida 24 horas después de la administración de la levadura se observa claramente como el grado de enriquecimiento decae drásticamente para todos los compuestos (Figura 82).

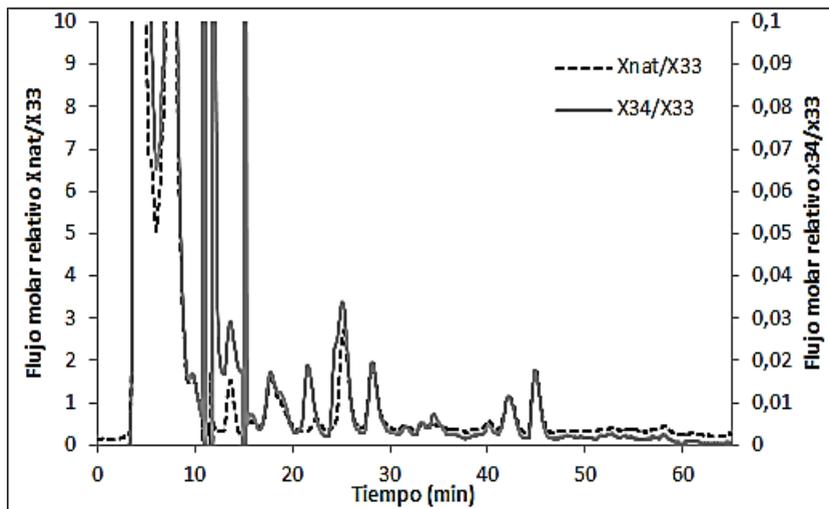


**Figura 79.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina control

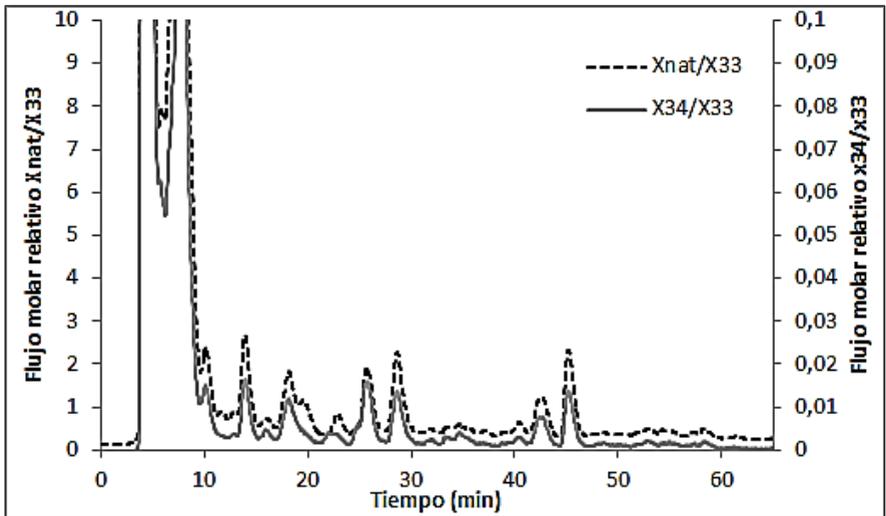
## 6- Experimentos con animales de laboratorio



**Figura 80.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina 6 horas

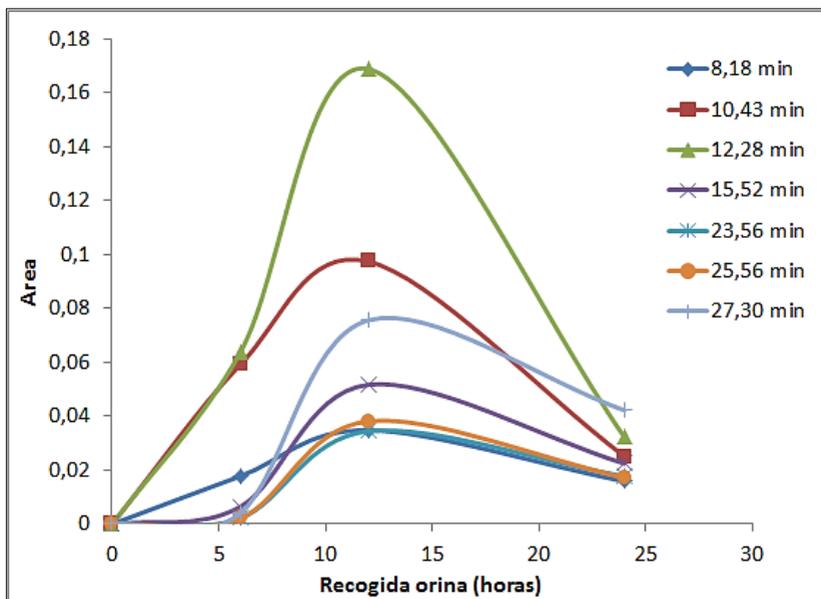


**Figura 81.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina 12 horas



**Figura 82.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina 24 horas

Para estudiar en mayor detalle el momento de máximo enriquecimiento de los metabolitos de azufre en orina, se procedió a la integración de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos del cromatograma de flujo molar relativo X34/X33 a 18, 25, 31, 34, 42, 45 y 52 minutos para los distintos momentos de recogida de la orina. Tal como se deducía de los cromatogramas, el máximo de enriquecimiento se observa en la orina recogida 12 horas después de la administración de la levadura enriquecida, produciéndose después un descenso del mismo (Figura 83).



**Figura 83.** Variación de las áreas de varios picos del cromatograma de flujo molar relativo X34/X33 con el tiempo

## **6.2- Experimentos con ratones C57 sanos y enfermos de cáncer de próstata**

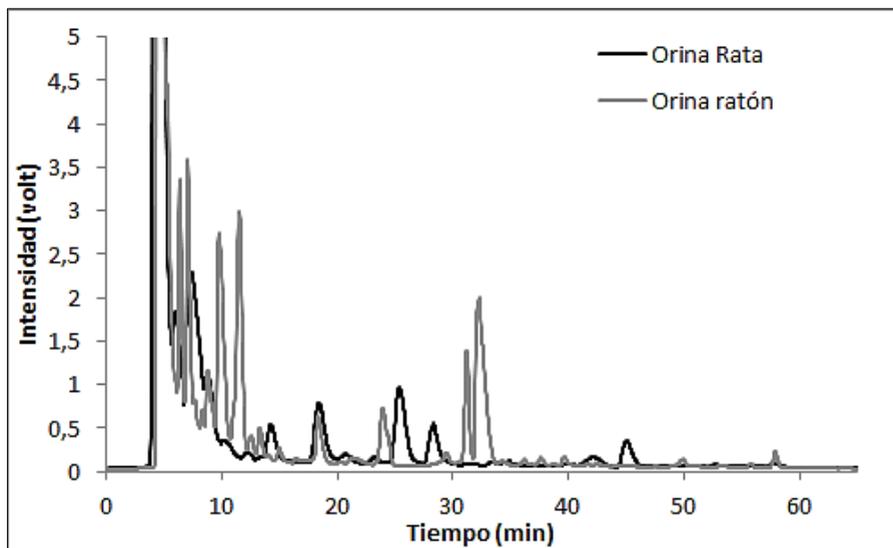
Los científicos que estudian enfermedades como tumores, diabetes, alzheimer, etc., suelen utilizar ratones de laboratorio modificados genéticamente para que desarrollen rápidamente ese tipo de enfermedades. En caso de no estar modificados genéticamente hay

enfermedades como los tumores que pueden inducirse tras la exposición a un agente tumoral.

El grupo de investigación Terapias Experimentales del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo tiene una amplia experiencia en el estudio del cáncer de próstata utilizando ratones del tipo C57BL/6 modificados genéticamente.

En nuestro caso, nos propusimos, en colaboración con este grupo de investigación, explorar la posibilidad de aplicar nuestra metodología para tratar de observar diferencias en los metabolitos de azufre en orina entre los individuos sanos y enfermos tras administrar la levadura enriquecida en azufre 34.

Para ello, se volvió a evaluar la metodología esta vez utilizando la orina de ratones de laboratorio sanos como sujetos de pruebas. Se apreciaron pequeñas diferencias entre las orinas de los ratones y de las ratas llegando en este caso a separar más de 20 picos cromatográficos de azufre en la orina de los ratones (Figura 84).



**Figura 84.** Cromatograma de intensidades de orina de rata y de ratón

Dado que el peso de los ratones adultos (aproximadamente 25 gramos) es sensiblemente inferior al de las ratas, se tuvieron que recalcular las cantidades de levadura que se iba a administrar en función del peso del animal. Además, en los experimentos anteriores vimos como la levadura era lo suficientemente líquida como para poder administrarla sin diluirla en agua, haciendo que la marca isotópica de azufre 34 quedase menos diluida. Este hecho, unido a que los ratones no podían ingerir una gran cantidad de producto, hizo que elimináramos el agua mili-Q y sólo administráramos levadura enriquecida.

La cantidad que se administró fue 0,6 gramos de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$  (379  $\mu\text{g/g}$  azufre total y 66% enriquecimiento en  $^{34}\text{S}$ ). Los tiempos de recogida de la orina variaron ya que conocíamos que la marca

isotópica en la orina se iba a observar a las 12 horas. Por lo tanto, las orinas se recogieron a las 0, 12 y 24 horas después de administrar la dosis de levadura.

Para trabajar con ratones tuvimos que adquirir una nueva jaula metabólica (Figura 85) ya que la que se utilizaba con anterioridad no era adecuada para estos animales debido a sus dimensiones.



**Figura 85.** *Jaula metabólica especial para ratones*

Inicialmente se estudió la incorporación de azufre <sup>34</sup> en 2 ratones sanos y 2 ratones enfermos de cáncer de próstata en estado avanzado. Los

animales fueron alojados en una jaula metabólica a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Después de un corto periodo de aclimatación los ratones eran alimentados con la levadura enriquecida en azufre 34 (Figura 86).



**Figura 86.** Administración de levadura enriquecida a un ratón mediante sonda oral

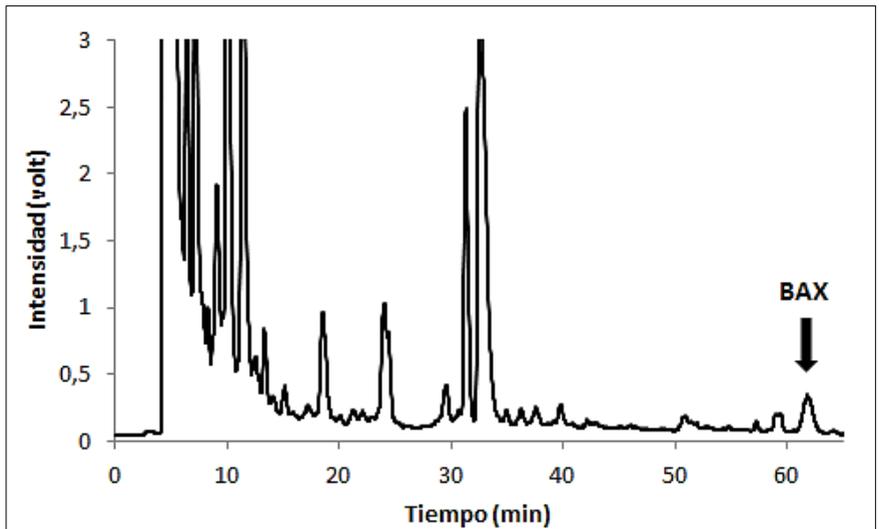
La metodología analítica utilizada fue la optimizada en el segundo capítulo de la presente Tesis Doctoral (ver apartado 5.4).

### **6.2.1- Normalización de los tiempos de retención**

Desafortunadamente, al inyectar las distintas muestras de orina se observaron variaciones importantes en los tiempos de retención de los picos cromatográficos debido, probablemente, a diferencias en la concentración salina de las muestras de orina. Para corregir estas

variaciones se añadió a las muestras un patrón interno para normalizar los tiempos de retención. El compuesto utilizado como patrón interno fue el péptido de inhibición BAX V5. Este péptido contiene 5 aminoácidos de los cuales uno de ellos es metionina, y por lo tanto contiene azufre. Se añadían 20  $\mu\text{L}$  de una disolución de 100 ppm en cada muestra de orina.

Cuando se inyectaba en disolución acuosa el compuesto aparecía al final del cromatograma cerca del minuto 60. Sin embargo, cuando se añade el compuesto a una muestra de orina se puede apreciar que aparece un poco retrasado debido a los efectos de matriz de la muestra (Figura 87).



**Figura 87.** Cromatograma obtenido para una orina a la que se ha añadido este compuesto como patrón interno

El proceso de normalización se realiza mediante el ajuste del patrón añadido a cada orina con el tiempo de retención del patrón en medio acuoso. De esta manera todos los tiempos de retención eran corregidos aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{(T_R BAX)_{acuoso}}{(T_R BAX)_{orina}} = \frac{(T_R \text{metabolito})_{corregido}}{(T_R \text{metabolito})_{orina}} \quad (30)$$

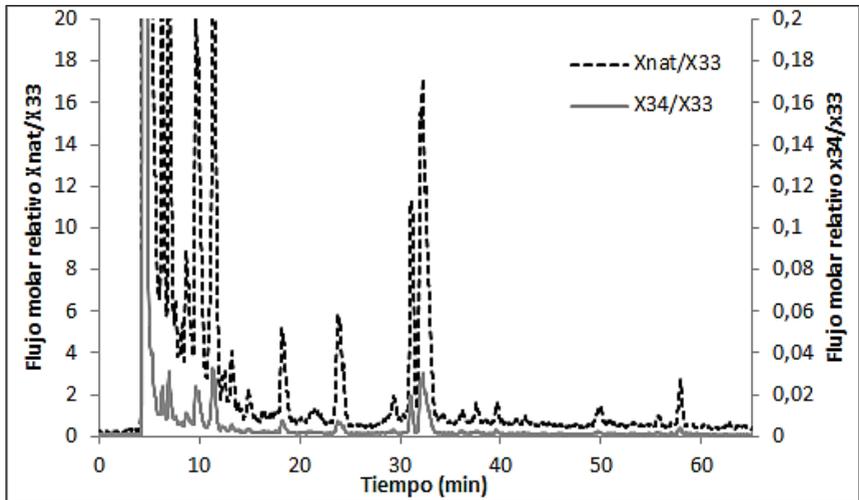
### **6.2.2- Análisis de muestras de orina recogidas**

Como se ha comentado previamente, en este experimento se utilizaron 4 animales, 2 ratones sanos y 2 ratones enfermos de cáncer de próstata. Estos últimos eran de edad avanzada por lo que se encontraban en el último estadio de la enfermedad de modo que el tumor podía ser identificado con total claridad en la próstata.

En comparación con las ratas, los ratones excretaban una menor cantidad de orina debido a su menor tamaño. Al igual que se hacía en los otros experimentos, las orinas se centrifugaban a alta velocidad y se almacenaban a - 20°C hasta su posterior análisis.

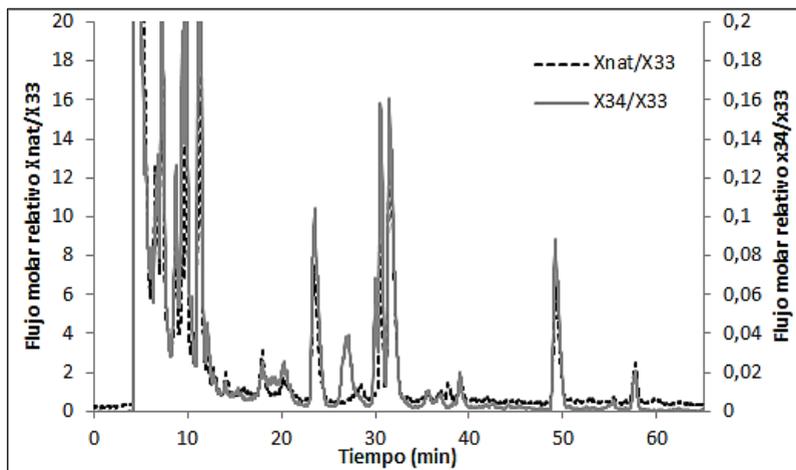
Las orinas fueron se recogieron transcurridas 12 y 24 horas desde la administración de la levadura enriquecida. También se tomó una muestra inicial (control) antes de administrar la levadura. Como esperábamos, en la muestra de las 12 horas se encontró el máximo de enriquecimiento en <sup>34</sup>S, mientras que a las 24 horas este enriquecimiento ya había sufrido un descenso notable.

En las Figura 88 a 90 se muestran los cromatogramas de flujo molar relativo para la orina excretada por uno de los ratones sanos. El trazo continuo representaría la cantidad de azufre 34 excretado. Como se puede observar, y al igual que sucedía con las ratas, aparece un enriquecimiento diferencial en este isótopo para ciertos metabolitos de azufre que es máximo a las 12 horas para luego ir decreciendo.

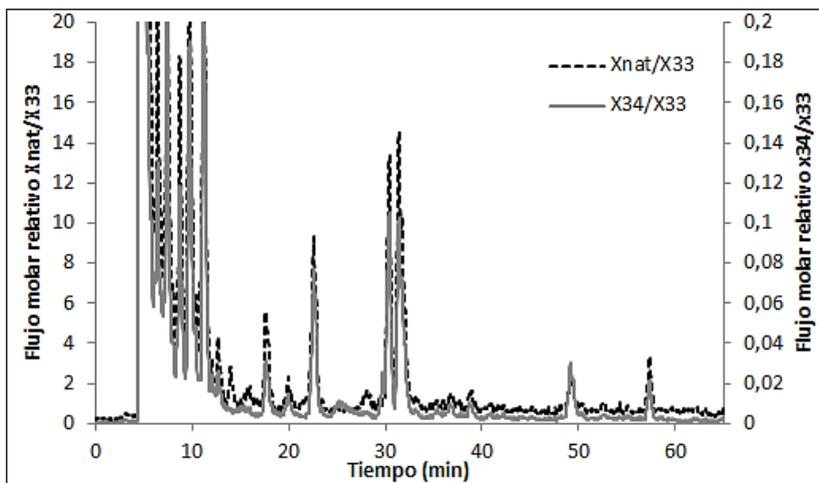


**Figura 88.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina control de ratón sano

## 6- Experimentos con animales de laboratorio



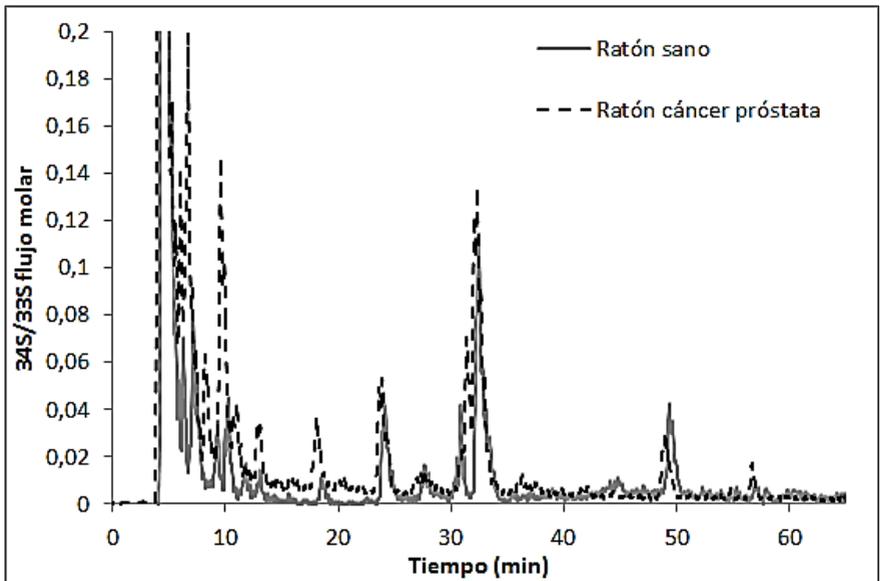
**Figura 89.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano obtenida 12 horas después de suministrar levadura enriquecida



**Figura 90.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano obtenida 24 horas después de suministrar levadura enriquecida

Las mismas medidas se repitieron para cada animal por separado, analizando la orina control, 12 horas y 24 horas. En todos los casos el comportamiento del azufre 34 era el mismo.

En la Figura 91 se representa un cromatograma de flujo molar relativo para un ratón sano y uno enfermo de cáncer de próstata tras la administración de la levadura enriquecida. Se puede observar como el perfil cromatográfico del ratón enfermo se encuentra ligeramente por encima del ratón sano, lo que implicaría una mayor excreción de azufre 34.



**Figura 91.** Cromatograma de flujo molar relativo para orina de ratón sano y ratón enfermo de cáncer de próstata

En los cromatogramas pueden observarse cerca de 20 compuestos de azufre incluyendo un amplio pico correspondiente al azufre inorgánico que aparece al principio del cromatograma. La identidad de la mayor parte de los compuestos era desconocida, siendo el glutatión y la metionina los picos que eluyen a los 5,7 y 7 minutos respectivamente. Ningún otro pico cromatográfico se correspondía con los patrones de azufre disponibles en nuestro laboratorio (cisteína, cistina, taurina, homocisteína, cistatión, cisteinín-glicina).

### **6.2.3- Comparativa entre ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata**

Una vez analizadas las muestras de orina recogidas para todos los ratones se procedió a realizar una comparativa entre ratones sanos y enfermos. En esta comparativa se intentaron encontrar señales de la marca isotópica de azufre 34 que nos permitiera diferenciar entre ambas poblaciones.

El tratamiento de los datos que se realizó fue el siguiente:

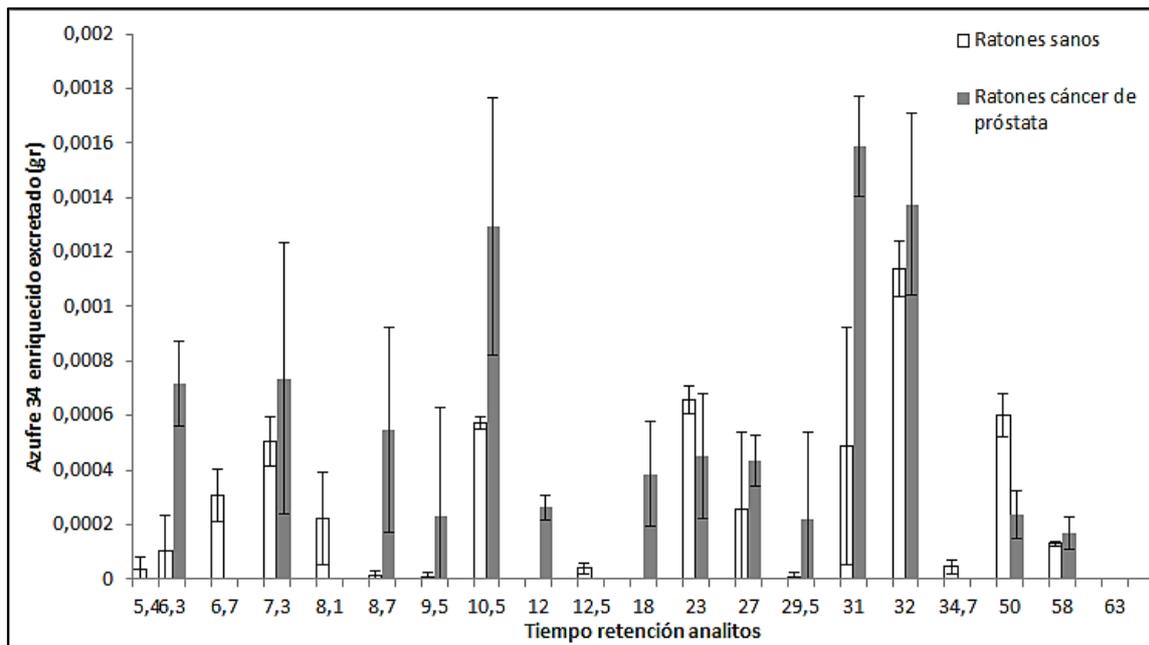
1. Los cromatogramas de intensidades se transformaron en cromatogramas de flujo molar relativo de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito (ver apartado 5.4).
2. Se normalizaron los tiempos de retención para todos los picos cromatográficos utilizando el tiempo de retención del patrón interno añadido a todas las muestras de orina.
3. Se integraron las áreas de los picos cromatográficos para las relaciones  $X_{nat}/X_{33}$  y  $X_{34}/X_{33}$  utilizando el programa Origin Pro.

4. Se calculó la cantidad de azufre enriquecido <sup>34</sup> total excretado en cada pico cromatográfico teniendo en cuenta los volúmenes de orina recogidos en cada toma de muestra.
5. Finalmente, se calculó la cantidad de azufre enriquecido correspondiente a cada pico cromatográfico acumulada a lo largo de las 24 horas posteriores a la administración de la levadura enriquecida.

Este estudio se realizó tanto para ratones sanos como para ratones enfermos. Nuestra intención era conocer si alguna de las dos poblaciones incorporaba y excretaba en mayor medida la marca isotópica de la levadura. Se compararon los resultados obtenidos para los metabolitos de azufre que generaban mayores señales cromatográficas, tanto en ratones sanos como en ratones enfermos de cáncer de próstata. Como se puede observar en la Figura 92, los ratones enfermos tienen tendencia a incorporar mayor cantidad de azufre <sup>34</sup> en sus metabolitos con respecto a los ratones sanos.

Este hecho se explicaría por la teoría, ya comentada, de que las células tumorales son dependientes de metionina, esto es, este tipo de células necesitan un mayor aporte de metionina ya que se reproducen a un ritmo mucho mayor que las normales por lo que necesitan mayor aportación de fuentes de azufre.

## 6- Experimentos con animales de laboratorio

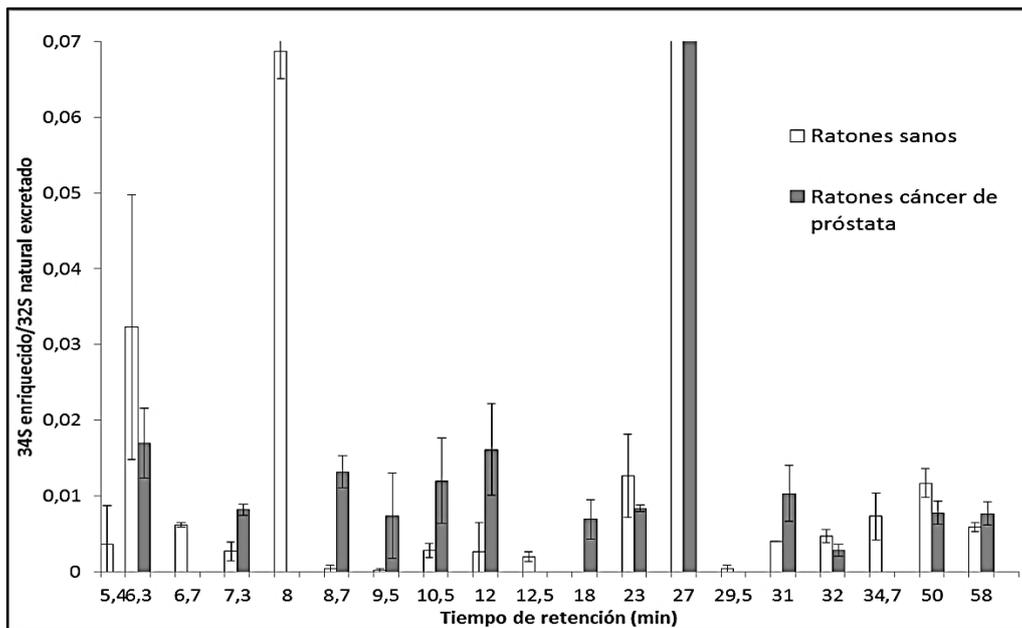


**Figura 92.** Azufre enriquecido total excretado para los ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata

Se estudió la relación de  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural excretado en las 24 horas posteriores a la administración de la levadura enriquecida. Esta relación de  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural serviría como indicativo del grado de enriquecimiento para los metabolitos de azufre presentes en la orina de estos animales.

Analizando los datos de este modo nos encontramos que el grado de enriquecimiento era, en general, mayor para los compuestos de azufre excretados en la orina de los ratones enfermos de cáncer de próstata (Figura 93).

## 6- Experimentos con animales de laboratorio



**Figura 93.** Grado de enriquecimiento (relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural excretado) para los ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata

### **6.3- Estudio de la evolución de la enfermedad en sus diferentes estadios**

Con objeto de verificar si realmente existían diferencias en el enriquecimiento isotópico detectado en los metabolitos de azufre presentes en la orina de ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata tras la ingestión de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$ , así como evaluar dichas diferencias en los diferentes estadios de la enfermedad, se realizó un estudio a lo largo de 40 semanas.

Para ello, se utilizaron seis ratones machos, tres de ellos sanos (WT) y tres modificados genéticamente para expresar cáncer de próstata a lo largo de su vida (TRAMP). Los ratones TRAMP tenían el mismo progenitor masculino y femenino.

<b>Número identificativo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Padre</b>	<b>Madre</b>
771	Macho	TRAMP	615	603-605
772	Macho	TRAMP	615	603-605
773	Macho	TRAMP	615	603-605
797	Macho	WT	539	656
809	Macho	WT	540	543
875	Macho	WT	539	573

**Tabla 25.** *Identificación ratones utilizados*

Como en los experimentos anteriores, los animales fueron alojados en una jaula metabólica a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Después de un corto periodo de aclimatación los ratones eran alimentados con la levadura enriquecida en azufre  $^{34}\text{S}$ .

Como en este caso se utilizaban ratones desde una edad muy temprana, para evitar causar daño a los mismos durante la administración de la levadura, los ratones fueron anestesiados con isoflurano. El isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) es un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio.

Una vez que los ratones estaban anestesiados se les administraba la levadura con una sonda oral. En estos experimentos se utilizó el nuevo stock de levadura enriquecida en azufre 34 sintetizada previamente, tal como se explica en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral.

La cantidad óptima de levadura tuvo que ser calculada en cada experimento debido al incremento de peso que experimentaban los ratones con la edad. Transcurridas 18 horas desde la administración de la levadura, la orina era recogida, se centrifugaba a 5.000 g durante 10 minutos para separar los sólidos en suspensión y se almacenaba a -20°C.

Este procedimiento se repitió cada 15 días con cada animal durante un año para estudiar los diferentes estadios de la enfermedad. Los ratones fueron sacrificados a las 40 semanas de vida cuando el cáncer estaba altamente extendido en los animales enfermos.

Las orinas recogidas fueron analizadas siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 5.4.

### **6.3.1- Normalización de los tiempos de retención**

Con objeto de mejorar la normalización de los tiempos de retención, y basándonos en la experiencia adquirida, se decidió utilizar un método de normalización polinomial de orden 2. Para ello, en todos los cromatogramas se detectaron 4 picos cromatográficos que siempre aparecían y eran fáciles de identificar (el correspondiente a los sulfatos y los picos cromatográficos que aparecían en torno a 24, 32 y 48 minutos). Se utilizó una orina de ratón c-57 como cromatograma de referencia para la normalización del resto de cromatogramas obtenidos a lo largo del experimento. La ecuación polinomial de orden 2 utilizada fue la siguiente:

$$Y = a + bX + cX^2 \quad (31)$$

Donde X representa el tiempo de retención e Y los valores normalizados. Los coeficientes a, b y c fueron obtenidos utilizando los 4 picos de referencia previamente citados. De esta manera los tiempos de retención de los demás picos pudieron ser normalizados utilizando dicha función.

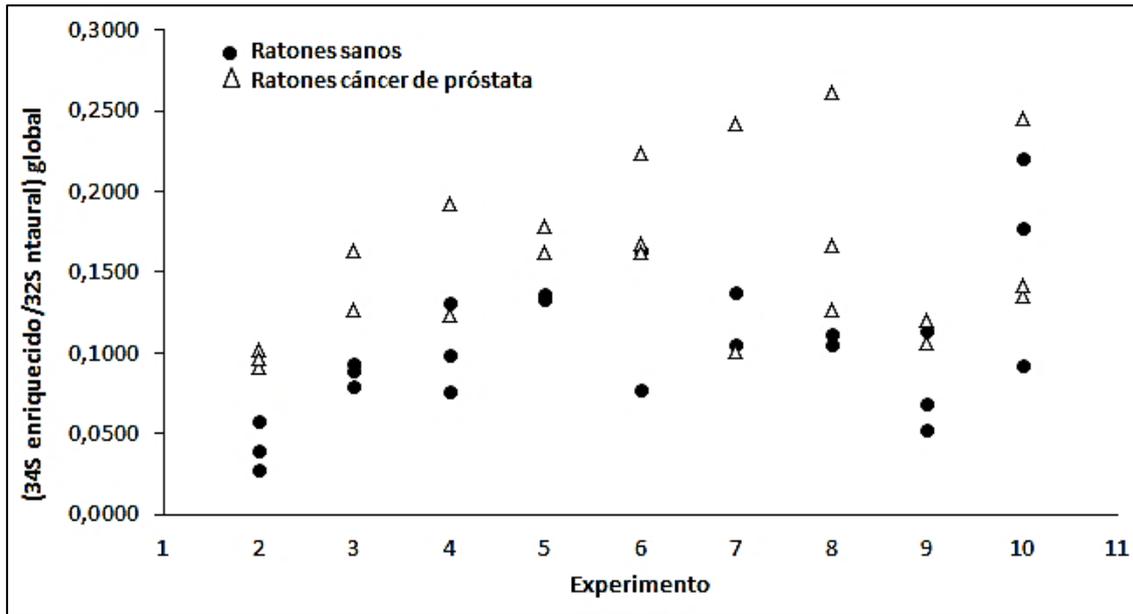
### **6.3.2- Evolución del enriquecimiento de los metabolitos con el tiempo**

Para llevar a cabo el estudio de la evolución con el tiempo se utilizó la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural hallada a partir de los cromatogramas de flujo molar relativo.

### 6.3.2.1- Enriquecimiento global

En primer lugar se calculó el enriquecimiento global sumando el enriquecimiento que se producía en todos los metabolitos de azufre excretados en la orina de una misma muestra. Dicho de otra manera, procedimos a sumar los valores de la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural de cada uno de los compuestos de azufre presentes en la orina con objeto de evaluar si se producía una mayor incorporación de  $^{34}\text{S}$  enriquecido después de ingerir la levadura por parte de una de las dos poblaciones.

Como se puede observar en la Figura 94, los ratones enfermos de cáncer de próstata (triángulos blancos) tienen un mayor enriquecimiento global con respecto a los ratones sanos (círculos negros). Según los datos obtenidos, los ratones enfermos excretarían mayor cantidad de  $^{34}\text{S}$  enriquecido en la orina y por lo tanto también habían incorporado una mayor cantidad de esta marca isotópica de la levadura. Además, esta tendencia se observó desde el primer experimento realizado, indicando que el metabolismo de ratones sanos y enfermos es diferente desde los primeros estadios de la enfermedad.



**Figura 94.** Enriquecimiento global de ratones sanos y enfermos en cada experimento

El enriquecimiento global medio para ratones sanos y ratones con cáncer de próstata fue 0,0978 y 0,1897 respectivamente. El valor para ratones enfermos es casi dos veces superior respecto al de los ratones sanos.

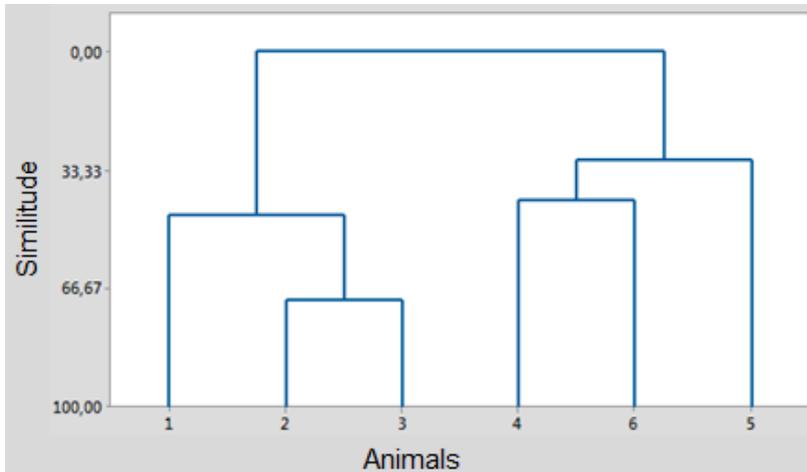
Para corroborar la diferencia entre ambas poblaciones en los diferentes estadios de la enfermedad se estudiaron los datos obtenidos mediante análisis de clústers utilizando el grado de enriquecimiento de azufre. Este tipo de análisis busca objetos que se encuentran cercanos en la variable espacio.

La distancia,  $d$ , entre dos puntos en un espacio  $n$ -dimensional con coordenadas  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (en nuestro caso la relación  $^{32}\text{S}$  natural/ $^{34}\text{S}$  enriquecido de  $n$  metabolitos para un ratón) e  $y_1, y_2, \dots, y_n$  (la relación  $^{32}\text{S}$  natural/ $^{34}\text{S}$  enriquecido para los mismos  $n$  metabolitos de otro ratón) es calculada mediante el programa MiniTab utilizando la distancia Euclídea:

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad (32)$$

El resultado de este proceso es un dendograma donde se muestran los puntos más cercanos, en nuestro caso los animales que tienen un enriquecimiento isotópico de azufre similar.

En la figura 95 se muestra un dendograma para la semana 11 (estadio temprano de la enfermedad) del experimento, donde se pueden apreciar dos clústers, uno para ratones sanos (ratón 1 al 3) y otro para ratones enfermos (ratón 4 al 6). En general este comportamiento se observó en los diferentes estadios de la enfermedad, obteniendo dendogramas similares.

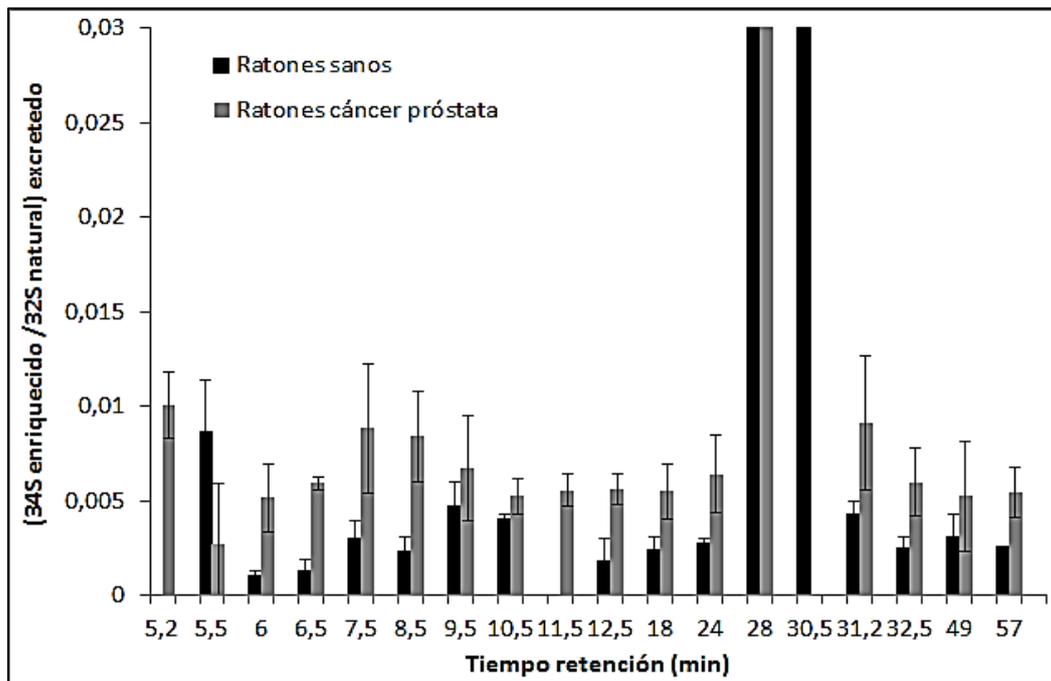


**Figura 95.** Dendrograma semana 11 del experimento

### 6.3.2.2- Enriquecimiento individual

El siguiente paso consistió en estudiar el enriquecimiento en azufre  $^{34}\text{S}$  para los compuestos de azufre individualmente. Se halló la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural para cada compuesto excretado tanto en ratones sanos como en ratones enfermos. Después se obtuvo el valor medio junto con su desviación estándar para las dos poblaciones y se compararon los resultados en cada experimento. La comparativa para el experimento 2 se muestra en la Figura 96.

## 6- Experimentos con animales de laboratorio

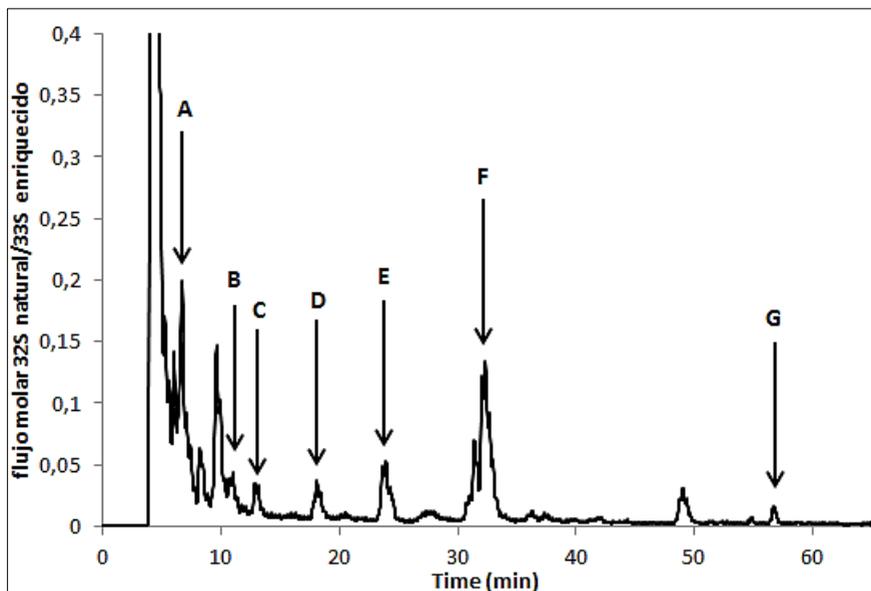


**Figura 96.** Comparativa de enriquecimiento individual de ratones sanos y enfermos

Como se puede apreciar se obtenía un mayor enriquecimiento en muchos de los metabolitos de azufre excretados en la orina en el caso de los ratones de cáncer de próstata. Además, al igual que sucedía con el enriquecimiento global, se podían apreciar diferencias entre ambas poblaciones desde los primeros estadios de la enfermedad.

Sin embargo, algunos metabolitos presentaban una alta incertidumbre en el valor de la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural. Este hecho se puede achacar a la propia variabilidad, no controlable, que se produce al trabajar con seres vivos. Por ello, fue necesario centrarse en los compuestos que fueran estadísticamente diferentes entre ambas poblaciones. Para identificar estos compuestos se llevó a cabo un tratamiento de los datos con ANOVA.

El valor medio del enriquecimiento para cada metabolito se calculó a lo largo de los 9 experimentos realizados para cada ratón. Después, el método de ANOVA se aplicó para encontrar aquellos compuestos de azufre que mostraban un comportamiento estadísticamente diferente en cada población. Estos metabolitos fueron los que aparecen a los siguientes tiempos de retención: 7, 12,5, 13,5, 18, 24, 32,5 y 57 minutos (Figura 97). Estos 7 compuestos son los que se utilizaron en los estudios posteriores.



*Figura 97. Metabolitos seleccionados para los estudios metabólicos*

### **6.3.3- Análisis de componentes principales**

Como se ha visto en el tratamiento de los resultados tanto para el enriquecimiento global como para el enriquecimiento individual en azufre 34, se encontraron diferencias entre ambas poblaciones. Además, la diferenciación entre ambas poblaciones puede apreciarse desde los primeros estadios de la enfermedad. Para corroborar este hecho, se realizó un análisis de componentes principales para los 9 experimentos realizados.

El método de análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para clasificar las dos poblaciones. El PCA encuentra las causas de la variabilidad y las ordena en función de su importancia. La idea es encontrar componentes principales ( $PC_1, PC_2, \dots, PC_n$ ) que sean combinaciones lineales de las variables originales ( $X_1, X_2, \dots, X_n$ ), en nuestro caso la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural de  $n$  metabolitos

$$PC_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$PC_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n$$

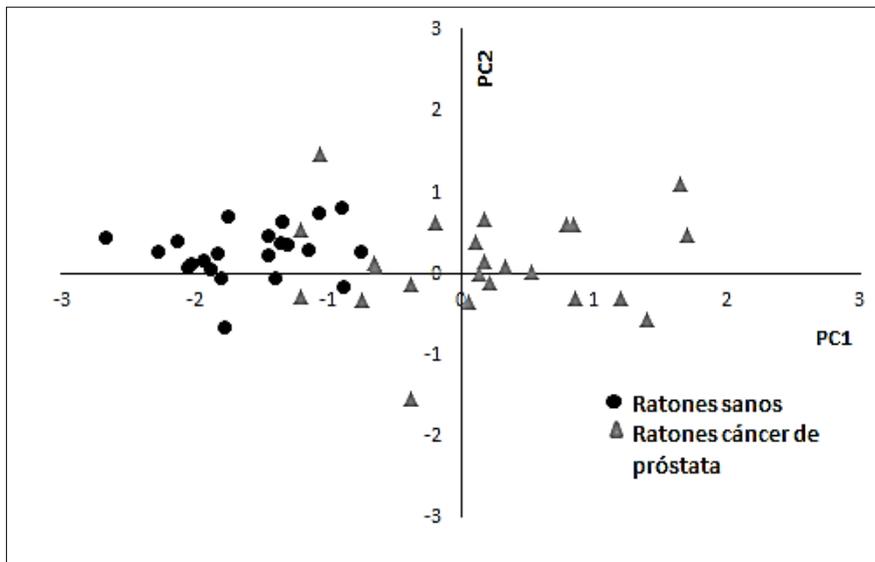
*etc*

Los coeficientes  $a_{11}, a_{12},$  etc., son calculados de forma que el componente principal 1 ( $PC_1$ ) recoja la mayor parte de la variación presente en los datos, el segundo componente principal ( $PC_2$ ) recoja la siguiente mayor variación y así sucesivamente. Es importante apuntar que los datos deben ser normalizados antes de realizar el método de PCA, ya que de esta forma todas las variables tienen la misma importancia. La principal variación puede ser encontrada en los dos primeros componentes principales ( $PC_1, PC_2$ ) donde en muchos casos puede encontrarse hasta un 90% de la variabilidad de los datos. En este tratamiento solo se utilizaron los metabolitos en los que se había confirmado una diferencia estadística entre ratones sanos y enfermos por el método de ANOVA. Además, como se ha comentado, los datos fueron normalizados. El programa utilizado para el tratamiento de los datos fue MiniTab.

En la figura 98 se representa el componente principal 1 ( $PC_1$ ) en el eje de abscisas y el componente principal 2 ( $PC_2$ ) en el eje de ordenadas para los 9 experimentos. Los ratones sanos se encuentran situados en la

## 6- Experimentos con animales de laboratorio

parte izquierda del eje y mientras que los ratones con cáncer de próstata se suelen encontrar en la parte derecha de este eje. Esta tendencia pudo observarse desde los primeros experimentos analizados indicando que los animales podían ser clasificados en una u otra población desde los estados iniciales de la enfermedad.



**Figura 98.** Análisis PCA para ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata

### **6.3.4- Análisis discriminante**

Finalmente, se llevó a cabo un análisis discriminante para catalogar unos ratones desconocidos en sus respectivos grupos: ratones sanos (grupo A) o ratones enfermos (grupo B). Para cada grupo de animales se calculó una función discriminante lineal,  $Y$ , que es una combinación de las variables originales  $X_1, X_2, \dots, X_n$ , en nuestro caso la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural de  $n$  metabolitos:

$$Y_A = a_{A1} X_1 + a_{A2} X_2 + \dots + a_{An} X_n$$

$$Y_B = a_{B1} X_1 + a_{B2} X_2 + \dots + a_{Bn} X_n$$

Los coeficientes  $(a_{A1}, a_{A2}, \dots, a_{An}, a_{B1}, a_{B2}, \dots, a_{Bn})$  fueron obtenidos utilizando el programa MiniTab. Después las relaciones  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural para las muestras de ratones desconocidos fueron multiplicadas por estos coeficientes para obtener los valores  $Y_A$  e  $Y_B$  en cada caso. La muestra será asignada al grupo con el valor  $Y$  más alto. Como ocurría en el análisis de PCA, los datos fueron previamente normalizados antes de este procedimiento.

Se procedió a analizar 7 ratones desconocidos para catalogarlos en uno de los dos grupos mediante este procedimiento. Los valores  $Y_A$  e  $Y_B$  para 7 muestras se exponen en la siguiente tabla. En todos los casos los ratones fueron asignados correctamente al grupo al que pertenecía

6- Experimentos con animales de laboratorio

---

<b>Ratón</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Y<sub>a</sub> (sano)</b>	0,73	2,11	1,66	12,97	48,31	2,69	6,43
<b>Y<sub>b</sub> (enfermo)</b>	-1,40	1,89	1,01	22,74	81,43	2,92	10,79
<b>Análisis discriminante</b>	Sano	Sano	Cáncer próstata	Cáncer próstata	Sano	Cáncer próstata	Cáncer próstata
<b>Estado real</b>	Sano	Sano	Cáncer próstata	Cáncer próstata	Sano	Cáncer próstata	Cáncer próstata

**Tabla 26.** *Análisis discriminante para 7 ratones desconocidos*

## **6.4- Conclusiones**

1- En los primeros estudios realizados con ratas Wistar, se observó que el máximo enriquecimiento en los compuestos de azufre presentes en la orina, aparecían al cabo de 12 horas tras suministrar una dosis de levadura enriquecida en el isótopo  $^{34}\text{S}$  del azufre.

2- El estudio comparativo realizado con ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata muestran que tanto el enriquecimiento global en los compuestos de azufre presentes en la orina como la mayoría de los compuestos individualmente es mayor en el caso de ratones enfermos que en los sanos a las 18 horas de administrar una dosis de levadura enriquecida en  $^{34}\text{S}$ , si bien sólo 7 compuestos demostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al método ANOVA.

3- Contrariamente a lo esperado, no se produjeron cambios en las diferencias del enriquecimiento isotópico en azufre  $^{34}\text{S}$  entre ambas poblaciones durante el desarrollo de la enfermedad, si no que se mantenía constante desde el inicio de la misma, es decir los ratones pudieron ser diferenciados desde la primera etapa de la enfermedad antes de que el cáncer de próstata se manifestase. El tratamiento matemático de los datos obtenidos a lo largo de las 40 semanas mediante análisis de componentes principales permitió separar ambas poblaciones utilizando la relación  $^{34}\text{S}$  enriquecido/ $^{32}\text{S}$  natural de los 7 compuestos previamente seleccionados aplicando el método de ANOVA.

4- El análisis discriminante de 7 individuos desconocidos permitió asignar correctamente cada individuo a su grupo. Los resultados por tanto son esperanzadores en cuanto a que la metodología propuesta

## 6- Experimentos con animales de laboratorio

---

podiera ser utilizada para la detección precoz de este tipo de enfermedades, u otras enfermedades que estuvieran relacionadas con el metabolismo de azufre.

---

## **7- Sugerencias para trabajos futuros**



## 7- Trabajos futuros

---

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral y considerando las conclusiones expuestas en cada capítulo, es posible sugerir algunas líneas de investigación futuras, entre las que destacan las siguientes:

1. Identificar la naturaleza de las especies que presentan un enriquecimiento diferencial para ratones sanos y enfermos de cáncer de próstata. Dado que el ICP-MS no proporciona información estructural de la (bio)molécula de estudio sería necesario utilizar un análisis mediante técnicas de espectrometría de masas molecular, previo aislamiento de la fracción cromatográfica correspondiente.
2. Aplicación de la metodología desarrollada en otras enfermedades como pudiera ser otros tipos de cáncer, Alzheimer, envejecimiento celular, etc. La administración de la levadura enriquecida en azufre 34 permitiría observar cambios metabólicos en los organismos de estudio, siempre que el metabolismo del azufre resultase modificado debido a la enfermedad.
3. Uso de la metionina enriquecida en azufre 34 en estudios con cultivos celulares. La dependencia de metionina de las células tumorales hace de esta característica idónea en el uso del patrón de metionina sintetizado para el estudio de rutas metabólicas. Al igual que en los estudios con animales de laboratorio, sería interesante hacer una comparativa de la incorporación de la marca isotópica de azufre 34 en células sanas y células tumorales, e intentar vislumbrar diferencias entre ambas poblaciones.

## 7- Trabajos futuros

---

4. Por último, en función de los resultados encontrados utilizando los modelos animales, se podrían extender los estudios a seres humanos dada la nula toxicidad de la levadura enriquecida en azufre-34. De esta manera, idealmente se podría desarrollar un nuevo ensayo clínico utilizando isótopos estables enriquecidos de azufre.

---

## **8- Bibliografía**



- 
- [1] L. A. Komarnisky, R. J. Christopherso, T. K. Basu, **Sulfur: its clinical and toxicologic aspects**, *Nutrition*, 19 (2003), 54-61
- [2] J. T. Brosnan, M. E. Brosnan, **The sulfur-containing amino acids: an overview**, *The Journal of Nutrition*, 136 (2006), 1636-1640
- [3] Guoyao Wu, **Amino acids: metabolism, functions, and nutrition**, *Amino Acids*, 37 (2009), Issue 1, 1-17
- [4] L. D. Stegink, L. D. Besten, **Synthesis of Cysteine from Methionine in Normal Adult Subjects: Effect of Route of Alimentation**, *Science*, 178 (1972), 4060, 514-516
- [5] G. I. Giles, C. Jacob, **Reactive sulfur species: An emerging concept in oxidative stress**, *Biological Chemistry*, 383 (2002), 375-388
- [6] S. Tesseraud, S. M. Coustard, A. Collin, I. Seilliez, **Role of sulfur amino acids in controlling metabolism and cell functions: implications for nutrition**, *British Journal of Nutrition*, 101 (2009), 1132-1139
- [7] D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero, **Sulfur containing amino acids and human disease**, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58 (2004), 47-55
- [8] M. H. Stipanuk, **Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine**, *Annual Review of Nutrition*, 24 (2004), 539-577
- [9] A. K. Shoveller, B. Stoll, R. O. Ball, D. G. Burrin, **Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism**, *The Journal of Nutrition*, 135 (2005), 1609-1612

- [10] M. H. Stipanuk, **Metabolism of sulfur-containing amino-acids**, Annual Review of Nutrition, (1986), 179- 209.
- [11] J.D. Finkelstein, **Homocysteine: A history in progress**, Nutrition Reviews, 58 (2000), 193-204
- [12] R. Benesch, **Sulfur in Proteins, 1st Edition**, 2012
- [13] S. Métayer, I. Seilliez, A. Collin, S. Dechêne, Y. Mercier, P. A. Geraert, S. Tesseraud, **Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status**, Journal of Nutritional Biochemistry, 19 (2008), 207-215.
- [14] J. Lyons, A. Rauh-Pfeiffe, Y. M. Yu, X. M. Lu, D. Zurakowski, R. G. Tompkins, A. M. Ajami, V. R. Young, L. Castillo, **Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet**. Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS, 97 (2000), 5071-5076
- [15] S. C. Lu, **Regulation of glutathione synthesis**, Molecular Aspects of Medicine, 30 (2009), 42-59
- [16] M. E. Nimni, B. Han, F. Cordoba, **Are we getting enough sulfur in our diet?**, Nutrition and Metabolism, 4 (2007), 24-36
- [17] M.K. Johnson, **Iron—sulfur proteins: new roles for old clusters**, Curr. Opin. Chem. Biol., 2 (1998), 173
- [18] H. Beinert, R.H. Holm, E. Münck, **Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures**, Science, 277 (1997) 653
- [19] S. Roje, **S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor**, Phytochemistry, 67 (2006), 15, 1686–1698

- [20] D. Mischoulon, M. Fava, **Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence**, The American journal of clinical nutrition, 76 (2002), 5, 1158S-1161S
- [21] C. S. Lieber, **S-Adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders**, The American journal of clinical nutrition, 76 (2002), 5, 1183S-1187S
- [22] C. Di Padova, **S-Adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis: Review of the clinical studies**, The American Journal of Medicine, 83 (1987), 5, 1, 60–65
- [23] Globocan Project 2012, **Estimated Cancer Incidence an prevalence worldwide in 2012**
- [24] G. Andriole, E. Crawford, R. Grubb et al, **Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial**, New England Journal of Medicine, 360 (2009), 13, 1310–1319
- [25] F. H. Schröder, J. Hugosson, M. J. Roobol et al, **Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study**, New England Journal of Medicine, 360 (2009), 13, 1320–1328
- [26] D. W. Cramer, R. C. Bast, C. D. Berg et al, **Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens**, Cancer Prevention Research, 4 (2011), 3, 365–374
- [27] M.J. Duffy, et al, **Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update**, International Journal of Cancer, 134 (2014), 11, 2513–2522

- [28] T. Xu, X. Jia, X. Chen, Z. Ma, **Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using metal ions tagged immunocolloidal gold**, *Biosensors and Bioelectronics*, 56 (2014), 15, 174–179
- [29] J. Li et al , **Quantum-dot-tagged photonic crystal beads for multiplex detection of tumor markers**, *Chem. Commun.*, 50 (2014), 14589-14592
- [30] M. E. Anderson, **Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation**, *Chem Biol Interact*, 111 (1998), 1–14
- [31] B. C. Halpern, B. R. Clark, D. N. Hardy, R. M. Halpern, R. A. Smith, **The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture**, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71 (1974), 1133–1136
- [32] F. Breillout, E. Antoine, M. F. Poupon, **Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy**, *J. Nat. Cancer Inst.*, 82 (1990), 1628–1632
- [33] P. H. Stern, R. M. Hoffman, **Enhanced in vitro selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect**, *J. Nat. Cancer Inst.*, 76 (1986), 629–639
- [34] H. Y. Guo, H. Herrera, A. Groce, R. M. Hoffman, **Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture**, *Cancer Res.*, 53 (1993), 2479–2483
- [35] R. M. Hoffman, **Methionine dependence in cancer cells – a review**, *In Vitro*, 18 (1982), 421–428
- [36] W. Kreis, A. Baker, V. Ryan, A. Bertasso, **Effect of nutritional and enzymatic methionine deprivation upon human normal and malignant cells in tissue culture**, *Cancer Res.*, 40 (1980): 634–641

- [37] J. O. Mecham, D. Rowitch, C. D. Wallace, P. H. Stern, R. M. Hoffman, **The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117 (1983), 429–434
- [38] F. Poirson-Bichat, R. A. Goncalves, L. Miccoli, B. Dutrillaux, M. F. Poupon, **Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts**, *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6 (2000), 643–653
- [39] L. A. Poirier, M. J. Wilson, **The elevated requirement for methionine by transformed rat liver epithelial cells in vitro**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 349 (1980), 283–293
- [40] M. J. Tisdale, **Utilization of preformed and endogenously synthesized methionine by cells in tissue culture**, *Br. J. Cancer*, 49 (1984), 315–320
- [41] P. H. Stern, R. M. Hoffman, **Elevated overall rates of transmethyltion in cell lines from diverse human tumors**, *In Vitro*, 20 (1984), 663–670
- [42] J. G. Judde, M. Ellis, P. Frost, **Biochemical analysis of the role of transmethyltion in the methionine dependence of tumor cells**, *Cancer Res.*, 49 (1989), 4859–4865
- [43] T. Fiskerstrand, B. Christensen, O. B. Tysnes, P. M. Ueland, H. Refsum, **Development and reversion of methionine dependence in a human glioma cell line: relation to homocysteine remethylation and cobalamin status**. *Cancer Res.*, 54 (1994), 4899–4906
- [44] Y. Hoshiya, H. Guo, T. Kubota et al, **Human tumors are methionine dependent in vivo**, *Anticancer Res.*, 15 (1995), 717–718

[45] R. C. Theuer, **Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW10232 adenocarcinomas**, *J. Nutr.*, 101 (1971), 223–232

[46] D. M. Kokkinakis, S. C. Schold, H. Hori, T. Nobori, **Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice**, *Nutr. Cancer*, 29 (1997), 195–204

[47] H. Guo, V. K. Lishko, H. Herrera, A. Groce, T. Kubota, R. M. Hoffman, **Therapeutic tumor-specific cell cycle block induced by methionine starvation in vivo**, *Cancer Res.*, 53 (1993), 5676–5679

[48] N. Goseki, **L-Methionine and its potential effects for cancer therapy**, *Amino acids in critical care and cancer.*, 1994, 183–202

[49] W. Kreis, C. Hession, **Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor**, *Cancer Res.*, 33 (1973), 1866–1869

[50] Y. Tan, M. Xu, H. Guo, X. Sun, T. Kubota, R. M. Hoffman, **Anticancer efficacy of methioninase in vivo**, *Anticancer Res.*, 16 (1996), 3931–3936

[51] Y. Tan, J. Zavala, M. Xu, J. Zavala Jr, R. M. Hoffman, **Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients**, *Anticancer Res.*, 16 (1996), 3937–3942

[52] Y. Tan, J. Zavala, Q. Han et al, **Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high stage cancer patients**, *Anticancer Res.*, 17 (1997): 3857–3860

[53] D. M. Kokkinakis, R. M. Hoffman, E. P. Frenkel et al, **Synergy between methionine stress and chemotherapy in the treatment of**  
- 270 -

---

**brain tumor xenografts in athymic mice**, *Cancer Res.*, 61 (2001), 4017–4023

[54] Y. Hoshiya, T. Kubota, T. Inada, M. Kitajima, R. M. Hoffman, **Methionine-depletion modulates the efficacy of 5-fluorouracil in human gastric cancer in nude mice**, *Anticancer Res.*, 17 (1997), 4371–4375

[55] N. Goseki, M. Endo, T. Onodera, G. Kosaki, **Anti-tumor effect of L-methionine-deprived total parenteral nutrition with 5- fluorouracil administration on Yoshida sarcoma-bearing rats**, *Ann. Surg.*, 214 (1991), 83–88

[56] D. Machover, J. Zittoun, P. Broet et al, **Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and folinic acid**, *Biochem. Pharmacol.*, 61 (2001), 867–876

[57] D. Machover, J. Zittoun, R. Saffroy et al, **Treatment of cancer cells with methioninase produces DNA hypomethylation and increases DNA synthesis**, *Cancer Res.*, 62 (2002), 4685–4689

[58] D. M. Kokkinakis, M. A. von Wronski, T. H. Vuong, T. P. Brent, S. C. Schold Jr, **Regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by methionine in human tumour cells**, *Br. J. Cancer*, 75 (1997), 779–788

[59] J. C. Sloper, D. J. Arnott, B. C. King, **Sulphur metabolism in the pituitary and hypothalamus of the rat - a study of radioisotope-uptake after the injection of S-35 DL-cysteine, methionine, and sodium sulphate**, *Journal of Endocrinology*, 20 (1960), 9-23

[60] W. H. Johnson, R. D. Goodrich, J. C. Meiske, **Metabolism of radioactive sulfur from elemental sulfur, sodium sulfate and methionine by lambs**. *Journal of Animal Science*, 32 (1971), 778-783

[61] A. M. Seligman, J. Fine, **The production of radioactive plasma protein from amino acids containing radioactive sulfur**, Journal of Clinical Investigation, 22 (1943), 265-273

[62] C. Gerner, S. Vejda, D. Gelbmann, E. Bayer, J. Gotzmann, R. Schulte-Hermann, W. Mikulits, **Concomitant determination of absolute values of cellular protein amounts, synthesis rates, and turnover rates by quantitative proteome profiling**, Molecular and Cellular Proteomics, 1 (2002), 528- 537

[63] S. S. Walkenstein, J. Seifter, **Fate, distribution and excretion of S-35 promazine**, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 125 (1959), 283-286

[64] S. Symchowicz, W. D. Peckham, M. Eisler, P. I. Perlman, **The distribution and excretion of radioactivity after administration of 35S-labeled perphenazine (trilafon)**, Biochemical Pharmacology, 11 (1962), 417- 422

[65] W. D. Alexande, V. Evans, A. MacAulay, T. F. Gallagher, J. Londono, **Metabolism of 35S-labelled antithyroid drugs in man**, British Medical Journal, 2 (1969), 290-291

[66] F. E. Viteri, R. Warren, **Considerations on the use of radioisotopes in human nutrition research**, Food and Nutrition Bulletin, 23 (2002), 7-16

[67] E. Roth, **Critical evaluation of the use and analysis of stable isotopes**. Pure and Applied Chemistry, 69 (1997), 1753-1828

[68] R. Schoenheimer, D. Rittenberg, **Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism**.,Journal of Biological Chemistry, 111 (1935), 163-168

- [69] I. J. Griffin, **Using stable isotopes and isotope ratio mass spectrometry to study mineral metabolism in humans**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2002), 1186-1193
- [70] A. Rodríguez-Cea, M. R. Fernández de la Campa, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, **The use of enriched <sup>111</sup>Cd as tracer to study de novo cadmium accumulation and quantitative speciation in Anguilla anguilla tissues**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2006), 270-278
- [71] E. Sievers, K. Dorner, D. Garbe-Schonberg, J. Schaub, **Molybdenum metabolism: Stable isotope studies in infancy**, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 15 (2001), 185-191
- [72] J. R. Dainty, **Use of stable isotopes and mathematical modelling to investigate human mineral metabolism**, *Nutrition Research Reviews*, 14 (2001), 295-315
- [73] K. Y. Patterson, C. Veillon, **Stable isotopes of minerals as metabolic tracers in human nutrition research**, *Experimental Biology and Medicine*, 226 (2001), 271-282
- [74] S. Stürup, **The use of ICPMS for stable isotope tracer studies in humans: a review**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004), 273-282
- [75] S. Stürup, H. R. Hansen, B. Gammelgaard, **Application of enriched stable isotopes as tracers in biological systems: a critical review**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390 (2008), 541-554
- [76] A. E. Mutlib, **Application of stable isotope-labeled compounds in metabolism and in metabolism-mediated toxicity studies**, *Chemical Research in Toxicology*, 21 (2008), 1672-1689

[77] H. O. Singher, L. Marinelli, **Distribution of radioactive sulfur in the rat.** *Science*, 101 (1945), 414-415

[78] D. V. Davies, L. Young, **The distribution of radioactive sulfur (<sup>35</sup>S) in the fibrous tissues, cartilages and bones of the rat following its administration in the form of inorganic sulphate,** *Journal of Anatomy*, 88 (1954), 174-83

[79] F. J. Zhao, K. C. J. Verkampen, M. Birdsey, M. M. A. Blake-Kalff, S. P. McGrath, **Use of the enriched stable isotope <sup>34</sup>S to study sulphur uptake and distribution in wheat,** *Journal of Plant Nutrition*, 24 (2001), 1551-1560

[80] B. P. Jensen, C. Smith, I. D. Wilson, L. Weidolf, **Sensitive sulphur-specific detection of omeprazole metabolites in rat urine by high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry,** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (2004), 181-183

[81] J. Giner Martínez-Sierra, F. Moreno Sanz,, P. Herrero Espílez, R. Santamaria-Fernandez, J. M. Marchante Gayón, and J. I. García Alonso, **Sulphur tracer experiments in laboratory animals using <sup>34</sup>S-labelled yeast.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013), 9,2889-2899

[82] V. W. Hu, D. S. Heikka, Radiolabeling **revisited: metabolic labeling with <sup>35</sup>S-methionine inhibits cell cycle progression, proliferation, and survival.** *FASEB Journal*, 14 (2000), 448-454

[83] O. W. Griffith, **Mammalian sulfur amino-acid metabolism - An overview,** *Methods in Enzymology*, 143 (1987), 366-376

[84] J. W. Anderson, **Assimilation of inorganic sulfate into cysteine,** New York, USA, 5 (1980), 203

- [85] D. Thomas, Y. Surdin-Kerjan, **Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae***. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1997), 503-532
- [86] D. Porro, M. Sauer, P. Branduardi, D. Mattanovich, **Recombinant protein production in yeasts**, *Molecular Biotechnology*, 31 (2005), 245-259
- [87] S. Esmaeili, K. Khosravi-Darani, R. Pourahmad, R. Komeili, **An Experimental Design for Production of Selenium-Enriched Yeast**, *World Applied Sciences Journal*, 19 (2012), 31-37
- [88] L. H. Reyes, F. Moreno Sanz,, P. Herrero Espílez, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, **Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis HPLC-ICP-MS**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (2004), 1230-1235
- [89] L. H. Reyes, J. R. Encinar, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, **Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after “in vitro” gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1110 (2006), 1–2, 31, 108–116
- [90] H. Chassaing et al, **2-Dimensional gel electrophoresis technique for yeast selenium-containing proteins—sample preparation and MS approaches for processing 2-D gel protein spots**, *J Anal At Spectrom.*, 19 (2004), 85–95
- [91] R. Lobinski et al, **Species selective determination of selenium compounds in biological materials**, *Pure Appl Chem.*, 72 (2000), 447–461

[92] P. D. Whanger, **Selenium and its relationship to cancer: an update**, *Br J Nutr*, 91 (2004), 11–28.

[93] W. Q. Wei et al, **Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death**, *Am J Clin. Nutr.*, 79 (2004), 80–85

[94] K. El-Bayoumy et al, **Influence of selenium-enriched yeast supplementation on biomarkers of oxidative damage and hormone status in healthy adult males: a clinical pilot study**, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 11 (2002), 1459–1465

[95] X. Burbano et al, **Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admissions of HIV-infected participants**, *HIV Clin. Trials*, 3 (2002), 483–491

[96] J. Giner Martínez-Sierra, F. Moreno Sanz,, P. Herrero Espílez, R. Santamaria-Fernandez, J. M. Marchante Gayón, and J. I. García Alonso, **Biosynthesis of sulfur-34 labelled yeast and its characterisation by multicollector-ICP-MS**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007), 1105–1112

[97] T. Kimura, K. Suzuki, **Components of the Electron Transport System in Adrenal Steroid Hydroxylase isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin)**, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967), 485

[98] Y. Shimomura, M. Nishikimi, T. Ozawa, **Purification of the iron-sulfur protein, ubiquinone-binding protein, and cytochrome c 1 from a single source of mitochondrial Complex III**, *Biochem. Int.*, 8 (1984), 19

[99] M.H. Stipanuk, P.W. Beck, **Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat.**, *Biochem. J.*, 206 (1982), 267

- [100] Y. Z. Zhu et al, **Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats**, J Appl Physiol., 102 (2007), 261–268
- [101] G. Ellman, **Tissue sulfhydryl groups**, Arch. Biochem. Biophys, 8 (1959), 82, 70.
- [102] P. C. Jocelyn, **The effect of glutathione on protein sulphhydryl groups in rat-liver homogenates**, Biochem. J., 85 (1962), 480
- [103] A. Barath, S. Turi, I. Nemeth, C. Bereczki, B. Gellen, I. Haszon, P., **Different pathomechanisms of essential and obesity-associated hypertension in adolescents**, Monostori Pediatr. Nephrol., 21 (2006), 1419
- [104] S. Turi, A. Friedman, C. Bereczki, F. Papp, J. Kovacs, E. Karg, I. Nemeth, J., **Oxidative stress in juvenile essential hypertension**, Hypertens., 21 (2003), 145
- [105] I. Nemeth, D. Boda, **Blood glutathione redox ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants with IRDS**, Free Radic. Biol. Med., 16 (1994), 347
- [106] F. Tietze, **Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues**, Anal. Biochem., 27 (1969), 502
- [107] K. Kusmieriek, E. Bald, **Simultaneous determination of tiopronin and d-penicillamine in human urine by liquid chromatography with ultraviolet detection**, Analytica Chimica Acta, 590 (2007), 132–137
- [108] G. Chwatko, E. Bald, **Determination of different species of homocysteine in human plasma by high-performance liquid**

**chromatography with ultraviolet detection**, Journal of Chromatography A, 949 (2002), 141–151

[109] W. Chen, Q. Fang, D. Yang, H. Zhang, X. Song, and J. Foley, **A real-time colorimetric and ratiometric fluorescent probe for rapid detection of SO<sub>2</sub> derivatives in living cells based on a near-infrared benzopyrylium dye**, Anal. Chem., 87 (2015), 609–616

[110] A.R. Lippert, E.L. New, C.J. Chang, **Reaction-based fluorescent probes for selective imaging of hydrogen sulfide in living cells**, J. Am. Chem. Soc., 133 (2011), 10078–10080

[111] V.S. Lin, A.R. Lippert, C.J. Chang, **Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub>S production**, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110 (2013), 7131–7135

[112] Y. Qian, J. Karpus, O. Kabil, S.Y. Zhang, H.I. Zhu, R. Banerjee, et al., **Selective fluorescent probes for live-cell monitoring of sulphide**, Nat. Commun., 2 (2011), 495

[113] C. Liu, J. Pan, S. Li, Y. Zhao, L.Y. Wu, C.E. Berkman, et al., **Capture and visualization of hydrogen sulfide by a fluorescent probe**, Angew. Chem. Int. Ed Engl., 50 (2011), 10327–10329

[114] L.A. Montoya, M.D. Pluth, **Selective turn-on fluorescent probes for imaging hydrogen sulfide in living cells**, Chem. Commun., 48 (2012), 4767–4769

[115] M.Y. Wu, K. Li, J.T. Hou, Z. Huang, X.Q. Yu, **A selective colorimetric and ratiometric fluorescent probe for hydrogen sulfide**, Org. Biomol. Chem., 10 (2012), 8342–8347

- 
- [116] B.C. Dickinson, J. Peltier, D. Stone, D.V. Schaffer, C.J. Chang, **Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain**, *Nat. Chem. Biol.*, 7 (2011), 106-112
- [117] N. Dufton, J. Natividad, E.E. Verdu, J.L. Wallace, **Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: a comparative study utilizing a novel fluorescent probe**, *Sci. Rep.*, 2 (2012), 499
- [118] M. Lee, A. Sparatore, S.P. Del, E. McGeer, P.L. McGeer, **Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation**, *Glia*, 58 (2010), 103-113
- [119] G.K. Kolluru, X. Shen, S.C. Bir, C.G. Kevil, **Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection**, *Nitric Oxide*, 35c (2013), 5-20
- [120] H. Wang, W.S. Wang, H.S. Zhang, **A spectrofluorimetric method for cysteine and glutathione using the fluorescence system of Zn(II)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid complex**, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 57 (2001) 2403.
- [121] S.-C. Liang, H. Wang, Z.-M. Zhang, X. Zhang, H.-S. Zhang, **Direct spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl) benzoxazole**, *Anal. Chim. Acta*, 451 (2002), 211
- [122] M. Yang, S. A. Tomellini, **An HPLC detection scheme for underivatized amino acids based on tryptophan fluorescence recovery**, *Analytica Chimica Acta*, 409 (2000), 45-53
- [123] J. Furne, A. Saeed, M.D. Levitt, **Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values**, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295 (2008), R1479-R1485

[124] M.D. Levitt, M.S. Abdel-Rehim, J. Furne, **Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue**, *Antioxid. Redox Signal*, 15 (2011), 373–378

[125] T. Ubuka, T. Abe, R. Kajikawa, K. Morino, **Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography**, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 757(1) (2001), 31-7

[126] T. Ubuka, **Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues**, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 781 (2002), 227–249

[127] A. S. Stephen, D. P. Naughton, R. L. Pizzey, D. J. Bradshaw, G. R. Burnett, **In vitro growth characteristics and volatile sulfur compound production of *Solobacterium moorei***, *Anaerobe*, 26 (2014), 53-57

[128] H. Kataoka, K. Takagi, M. Makita, **Determination of total plasma homocysteine and related aminothiols by gas chromatography with flame photometric detection**, *Journal of Chromatography B*, 664 (1995), 421-425

[129] S. Bai, Q. Chen, C. Lu, J.-M. Lin, **Automated high performance liquid chromatography with on-line reduction of disulfides and chemiluminescence detection for determination of thiols and disulfides in biological fluids**, *Analytica Chimica Acta*, 768 (2013), 96–101

- 
- [130] P. Frank, B. Hedman, R. M.K. Carlson, T. A. Tyson, A. L. Roe, K. O. Hodgson, A large reservoir of sulfate and sulfonate resides within plasma cells from *Ascidia ceratodes*, revealed by X-ray absorption near-edge structure spectroscopy, **Biochemistry**, 26 (1987), 4975-4979
- [131] P. Frank, B. Hedman, R. M. K. Carlson, K. O. Hodgson, **Interaction of Vanadium and Sulfate in Blood Cells from the Tunicate *Ascidia ceratodes*: Observations Using X-ray Absorption Edge Structure and EPR Spectroscopies**, *Inorg. Chem.*, 33 (1994), 3794-3803
- [132] G. N. George, J. Byrd, D. R. Winge, **X-ray absorption studies of yeast copper metallothionein.**, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988), 8199-8203
- [133] A. Rempel, R.M. Cinco, M.J. Latimer, A.E. McDermott, R.D. Guiles, A. Quintanilha, R.M. Krauss, K. Sauer, V.K. Yachandra, M.P. Klein, **Sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy: a spectroscopic tool to examine the redox state of S-containing metabolites in vivo**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1997), 6122– 6127
- [134] I.J. Pickering, G.N. George, E.Y. Yu, D.C. Brune, C. Tuschak, J. Overmann, J.T. Beatty, R.C. Prince, **Analysis of sulfur biochemistry of sulfur bacteria using X-ray absorption spectroscopy**, *Biochemistry*, 40 (2001), 8138–8145
- [135] A. Prange, R. Chauvistre, H. Modrow, J. Hormes, H.G. Truper, C. Dahl, **Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur**, *Microbiology-Sgm*, 148 (2002), 267–276
- [136] N.L. Whitfield, E.L. Kreimier, F.C. Verdial, N. Skovgaard, K.R. Olson, **Reappraisal of H<sub>2</sub>S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular**

**signaling**, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 294 (2008), R1930–R1937

[137] R. A. Dombkowski, M. J. Russell, K. R. Olson, **Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout**, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 286 (2004), 678–685

[138] M. Strouhal,, R. Kizek,, J. Vacek,, L. Trnkova, M. Nemeč, **Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica***, Bioelectrochem., 60 (2003), 29–36

[139] B. Vissers, **Unique potentiometric detection systems for HPLC determination of some steroids in human urine**, J. Sep. Sci., 32 (2009), 167 – 179

[140] H. Y. Han, H. Tachikawa, **Electrochemical determination of thiols at single-wall carbon nanotubes and pqq modified electrodes**, Front. Biosci., 10 (2005), 931– 939

[141] J. Vacek, J. Petrek, R. Kizek, L. Havel et al, **Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture**, Bioelectrochem., 63 (2004), 347–351

[142] J.E. Doeller, T.S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R.P. Patel, J.R. Lancaster Jr., V.M. Darley-Usmar, D.W. Kraus, **Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues**, Anal. Biochem., 341 (2005), 40–51

[143] J.R. Koenitzer, T.S. Isbell, H.D. Patel, G.A. Benavides, D.A. Dickinson, R.P. Patel, V.M. Darley-Usmar, J.R. Lancaster Jr., J.E. Doeller, D.W. Kraus, **Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O<sub>2</sub>-dependent manner**, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292 (2007), H1953–H1960

- [144] W. R. LaCourse, C. O. Dasenbrock, **Pulsed electrochemical detection of sulfur-containing antibiotics following high performance liquid chromatography**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19 (1999), 239–252
- [145] V. P. Hanko et al, **Determination of Sulfur-Containing Antibiotics Using High-Performance Liquid Chromatography With Integrated Pulsed Amperometric Detection**, *Drug Development Research*, 53(2001), 268–280
- [146] T. Inoue, J. R. Kirchhoff, **Determination of Thiols by Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection at a Coenzyme Pyrroloquinoline Quinone Modified Electrode**, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 1349-1354
- [147] C. D. García, C. S. Henry, **Direct Determination of Carbohydrates, Amino Acids, and Antibiotics by Microchip Electrophoresis with Pulsed Amperometric Detection**, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 4778-4783
- [148] E. Camer, M. Rinaldi, S. Briganti, M. Picardo, S. Fanali, **Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry**, *J. Chromatogr. B*, 757 (2001), 69–78
- [149] P. Chaimbaulta, P. Albericb, C. Elfakira, M. Lafosse, **Development of an LC–MS–MS method for the quantification of taurine derivatives in marine invertebrates**, *Analytical Biochemistry*, 332 (2004), 215–225
- [150] Y. Chang et al, **Modified method for determination of sulfur metabolites in plant tissues by stable isotope dilution-based LC-ESI-MS/MS**, *Anal. Biochem.*, 442 (2013), 24–33

[151] M. H. A. El-Zohri, R. Cabala, H. Frank, **Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC–ESI–MS–MS**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005), 1871–1876

[152] E. O. Price, J. R. Smith, C. R. Clark, J. J. Schlager, M. L. Shih, **MALDI-ToF/MS as a diagnostic tool for the confirmation of sulfur mustard exposure**, *Journal of Applied Toxicology*, 20 (2000), 1, 193–197

[153] H. Wildner, **Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for the fast and sensitive determination and isotope ratio measurement of non-metals in high-purity process chemicals**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (1998), 573–578

[154] W. Jiang, D. B. Hibbert, G. Moran and R. Akter, **Measurement of gold and sulfur mass fractions in L-cysteine-modified gold nanoparticles by ICP-DRC-MS after acid digestion: validation and uncertainty of results**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012), 1465–1473

[155] S. El Balkhi, J. Poupon, J. M. Trocello, F. Massicot, F. Woimant and O. Laprevote, **Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection**, *Anal. Chem.*, 82 (2010), 6904–6910

[156] D. R. Bandura, V. I. Baranov, S. D. Tanner, **Detection of Ultratrace Phosphorus and Sulfur by Quadrupole ICPMS with Dynamic Reaction Cell**, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 7, 1497–1502

[157] R. S. Amais, G. L. Donati and J. A. Nobrega, **Application of the interference standard method for the determination of sulfur, manganese and iron in foods by inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Anal. Chim. Acta*, 706 (2011) 223–228

- 
- [158] A. Makishima and E. Nakamura, **High-resolution MC-ICPMS employing amplifiers with a 10(12) ohm resistor for bulk sulfur determination in biological and geological samples**, J. Anal. At. Spectrom., 27 (2012), 891-895
- [159] R. Clough, P. Evans, T. Catterick, E. H. Evans,  **$\delta^{34}\text{S}$  Measurements of Sulfur by Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Anal. Chem., 78 (2006), 17, 6126–6132
- [160] T. Wang. **Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS)**, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 30 (2007), 807-831
- [161] J. G. Martínez-Sierra, F. M. Sanz, P. H. Espílez, R. Santamaria-Fernandez, J. M. M. Gayón, J. I. G. Alonso, **Evaluation of different analytical strategies for the quantification of sulfur-containing biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the characterisation of  $^{34}\text{S}$ -labelled yeast**, J. Anal. At. Spectrom., 25 (2010), 989-997
- [162] M. Wind, H. Wesch and W. D. Lehmann, **Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry**, Anal. Chem., 73 (2001), 3006-3010
- [163] S. Hann, G. Koellensperger, C. Obinger, P. G. Furtmüller and G. Stinger, **SEC-ICP-DRC and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins**, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004), 74-79
- [164] S. El Balkhi, J. Poupon, J. M. Trocello, F. Massicot, F. Woimant and O. Laprevote, **Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma**

**mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection**, Anal. Chem. 82, (2010), 6904-6910

[165] Y. Ogra, K. Ishiwata, Y. Iwashita and K. T. Suzuki, **Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC-inductively coupled plasma-(octopole reaction system)-mass spectrometry and electrospray ionization-tandem mass spectrometry**, J. Chromatogr. A, 1093 (2005), 118-125

[166] O. Corcoran, J. K. Nicholson, E. M. Lenz, F. Abou-Shakra, J. Castro-Perez, A. B. Sage and I. D. Wilson, **Directly coupled liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry for the identification of drug metabolites in urine: application to diclofenac using chlorine and sulfur detection**, Rapid Commun. Mass Spectrom., 14 (2000), 2377-2384

[167] B. P. Jensen, C. Smith, I. D. Wilson and L. Weidolf, **Sensitive sulfur-specific detection of omeprazole metabolites in rat urine by high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry**, Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 (2004), 181-183

[168] Z. Stefánka, S. Hann, G. Koellensperger and G. Stingeder, **Investigation of the reaction of cisplatin with methionine in aqueous media using HPLC-ICP-DRCMS**, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004), 894-898

[169] M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder and G. Koellensperger, **Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins**, J. Anal. At. Spectrom., 20 (2005), 856-863

- 
- [170] Y. Ogra, T. Kitaguchi, N. Suzuki and K. T. Suzuki, **In vitro translation with [S-34]-labeled methionine, selenomethionine, and telluromethionine**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008), 45-51
- [171] M. Pfeffer, M. Maurer, G. Köllensperger, S. Hann, A. B. Graf and D. Mattanovich, **Modeling and measuring intracellular fluxes of secreted recombinant protein in *Pichia pastoris* with a novel 34S labeling procedure**, *Microb. Cell Fact.*, (2011), 10-47
- [172] S. D. Fernández, N. Sugishama, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, **Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics**, *Anal. Chem.*, 84 (2012), 14, 5851-5857
- [173] J. Rodríguez-Fernández, M. Montes-Bayón, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, **Gas chromatography double focusing sector-field ICP-MS as an innovative tool for bad breath research**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2001), 1051-1056
- [174] R. R. St. Remy, M. Montes-Bayón and A. Sanz-Medel, **Determination of total homocysteine in human serum by capillary gas chromatography with sulfur-specific detection by double focusing ICP-MS**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003), 299-305
- [175] N. S. Mokgalaka and J. L. Gardea-Torresdey, **Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Principles and applications**, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 41 (2006), 131-150
- [176] J. S. Becker, S. F. Boulyga, J. S. Becker, C. Pickhardt, E. Damoc and M. Przybylski, **Structural identification and quantification of protein phosphorylations after gel electrophoretic separation using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Int. J. Mass Spectrom.*, 228 (2003), 985-997

[177] J. S. Becker, M. Zoriy, U. Krause-Buchholz, J. S. Becker, C. Pickhardt, M. Przybylski, W. Pömpel and Gerhard Rödel, **In-gel screening of phosphorus and copper, zinc and iron in proteins of yeast mitochondria by LA-ICP-MS and identification of phosphorylated protein structures by MALDI-FT-ICR-MS after separation with two-dimensional gel electrophoresis**, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004), 1236-1243

[178] J. S. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, B. Wu, D. Salber, C. Palm and J. S. Becker, **Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)**, Mass Spectrom. Rev., 29 (2010), 156-175

[179] M.A. da Silva and M.A. Arruda, **Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves**, Metallomics, 5 (2013), 62-67

[180] J. S. Becker, M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, C. Pickhardt and K. Zilles, **Copper, zinc, phosphorus and sulfur distribution in thin section of rat brain tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: possibility for small-size tumor analysis**, J. Anal. At. Spectrom., 20 (2005), 912-917

[181] J. S. Becker, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher and K. Zilles, **Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry**, Anal. Chem., 77 (2005), 3208-3216

[182] R. Haselberg, G. J. de Jong and G. W. Somsen, **Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins**, J. Chromatogr. A, 1159 (2007), 81-109

- 
- [183] A. Prange and D. Pröfrock, **Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments and limitations**, Anal. Bioanal. Chem., 383 (2005), 372-389
- [184] A. Prange, D. Schaumlöffel, P. Bratter, A. N. Richarz and C. Wolf, **Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma – sector field mass spectrometry**, Fresenius J. Anal. Chem., 371 (2001), 764-774
- [185] A. Prange and D. Schaumlöffel, **Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms**, Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002), 441-453
- [186] C. F. Yeh, S. J. Jiang and T. S. His, **Determination of sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry**, Anal. Chim. Acta, 502 (2004), 57-63
- [187] K. G. Heumann, **Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements**, Mass Spectrometry Reviews, 11 (1992), 41-67
- [188] L.M. Thienpont, D. Stoeckl, A.P. De Leenheer, **Isotope dilution mass spectrometry and implementation of a common accuracy base for routine medical laboratory analysis: practice and prospects**, J. Mass Spectrom. 30 (1995) 771–774
- [189] S.J. Hill, L.J. Pitts, A.S. Fisher, **High-performance liquid chromatography- isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview**, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 120–126.
- [190] J.I. García Alonso, J. Ruiz Encinar, C. Sariego Muñoz, J.M. Marchante Gayón, A. Sanz-Medel, **Isotope dilution for trace metal**

**speciation**, in: G. Holland, S.D. Tanner (Eds.), *Plasma Source Mass Spectrometry: The New Millennium*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, pp. 327–346.

[191] J.I. García Alonso, P. Rodríguez-Gonzalez, **Isotope Dilution Mass Spectrometry**, RSC Publishing, 2013, Cambridge.

[192] N. Demuth, K.G. Heumann, **Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS**, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 4020–4027.

[193] P. Bermejo, J. L. Capelo, A.Mota, Y. Madrid, C. Cámara, **Enzymatic digestión and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry**, *Trends in Anal. Chemistry*, 23 (2004), 9.

[194] L. Yang, R. E. Sturgeon, S. McSheehy, Z. Mester, **Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry**, *J. of Chromatography A*, 1055 (2004), 177-184.

[195] V. D. Huerta, L. H. Reyes, J. Marchante-Gayón, M. L. F. Sánchez, A. Sanz-Medel, **Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003), 1243-1247.

[196] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González and J. I. G. Alonso, **Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry**, *J. Mass Spectrom.*, 49 (2014), 681–691