



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**APORTACIONES DE LA METABOLÓMICA A LA BIOMEDICINA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ALINE ESCONDRILLAS ANGELES**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas**  
**VOCAL:**                         **Profesor: Elizabeth Reyes López**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Georgina Hernández Montes**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna**  
**2° SUPLENTE:**              **Profesor: Manuel Gutiérrez Aguilar**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Red de Apoyo a la Investigación. Coordinación de la Investigación Científica**

**ASESOR DEL TEMA: Dra. Georgina Hernández Montes \_\_\_\_\_**

**SUSTENTANTE: Aline Escondrillas Angeles \_\_\_\_\_**

# ÍNDICE

Listado de Abreviaturas	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Fundamentos de la tecnología	9
1.1 Resonancia magnética nuclear	11
1.2 Espectrometría de masas	14
1.2.1 Sistemas acoplados a espectrometría de masas	15
2. Estrategias experimentales y análisis bioinformáticos	19
2.1 Recolección de muestra	19
2.2 Obtención de datos	20
2.2.1 Análisis de las muestras	20
2.2.2 Control de calidad	21
2.3 Procesamiento de datos y bioinformática	22
2.4 Interpretación y validación	25
3. Aplicaciones	26
3.1 Lipidómica	30
3.2 Glucómica	36
4. Aportaciones	37
4.1 Estudio del microbioma	37
4.2 Aportaciones a las ciencias forenses	42
4.3 Estudio del cáncer	44
4.4 Estudio de enfermedades neurodegenerativas	52
4.5 Estudio de enfermedades cardiovasculares	55
PERSPECTIVAS	58
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	63

## Listado de Abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
RMN	Resonancia magnética nuclear
EM	Espectrometría de masas
EM-EC	Espectrometría de masas acoplada a electroforesis capilar
EM-CL	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos
EM-CG	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases
ppm	partes por millón
h	hora
Da	dalton
MHz	Megahertz
T	tesla
mm	milímetro
mL	mililitro
°C	grado Celsius
HMP	Proyecto del microbioma humano
HMDB	Base de datos del metaboloma humano
KEGG	Enciclopedia de Kioto de genes y genomas
MSI	Iniciativa de estándares de metabolómica
PCA	Análisis de componentes principales
SOM	Mapa de auto-organización
USD	Dólar estadounidense
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMM	Red Mexicana de Metabolómica
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
SNC	Sistema nervioso central
ODC	Ornitina descarboxilasa
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
FDG-PET	Tomografía por emisión de positrones con fluorodeoxiglucosa
MCI	Deterioro cognitivo leve
ATP	Trifosfato de adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EAC	Enfermedad arterial coronaria
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
DHA	Ácido docosahexaenoico

## INTRODUCCIÓN

La metabolómica es la caracterización exhaustiva de los metabolitos en los sistemas biológicos. El metaboloma está compuesto por pequeñas moléculas intermediarias y productos del metabolismo, incluidos los que se asocian al almacenamiento y la utilización de la energía, los precursores de proteínas e hidratos de carbono, los reguladores de la expresión génica y las moléculas de señalización. Por lo tanto, el metaboloma como la totalidad de los metabolitos, representa en tiempo real un retrato funcional de la célula o el organismo. Las muestras más comúnmente analizadas en la metabolómica incluyen plasma, suero y orina, mientras que otros tipos de muestras como el líquido cefalorraquídeo y la saliva se usan con menos frecuencia. Algunos estudios metabolómicos también pueden analizar muestras de tejidos, tejidos completos e incluso organismos vivos mediante resonancia magnética nuclear *in vivo*. Además, es posible analizar muestras de cultivo celular y sobrenadantes. <sup>1</sup>

La metabolómica tiene varias ventajas importantes sobre la química clínica tradicional: como son los avances en las tecnologías computacionales, que permiten la interpretación de los datos de metabolitos en el contexto de su relación con las vías metabólicas; las recientes mejoras en la sensibilidad y especificidad de la detección de moléculas pequeñas, las cuales permiten la caracterización y cuantificación de perfiles metabólicos complejos en muestras biológicas, lo que resulta en la medición simultánea de docenas, o incluso cientos, de metabolitos en una sola muestra. Este nivel de detalle será particularmente importante para dirigir los esfuerzos en medicina de precisión, una disciplina en la que se necesita de biomarcadores confiables y reproducibles para la toma de decisiones clínicas bien informadas y para el diseño de los ensayos clínicos. <sup>2</sup>

El metaboloma puede considerarse la expresión definitiva del genoma, que proporciona información sobre el control y la regulación directos e indirectos a nivel de sistemas. Es muy dinámico ya que las moléculas pequeñas son absorbidas, sintetizadas, degradadas y se encuentran interactuando continuamente con otras moléculas, tanto dentro como entre los sistemas biológicos y con el medio ambiente. La metabolómica estudia moléculas pequeñas químicamente diversas dentro de un rango de masa molecular de 50-1500 Da. Las clases de compuestos químicos incluyen aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, alcaloides, compuestos fenólicos, lípidos y muchos más. Cada clase tiene propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas muy diferentes entre sí. Un simple intercambio de un grupo funcional o un cambio en la estereoquímica puede modificar por completo la función biológica de un metabolito. Por lo tanto, la elucidación de los metabolitos y el consiguiente razonamiento acerca de sus funciones deben guiarse por métodos robustos para evitar la identificación errónea. <sup>3</sup>

## **1. Fundamentos de la tecnología**

Un desafío al que se enfrentan los investigadores de metabolómica es la gran diversidad química de los compuestos en el metaboloma. Esto implica que no existe un enfoque único para analizar todos estos compuestos de manera efectiva. Hoy en día, las plataformas basadas en espectrometría de masas predominan debido a su capacidad para identificar una amplia gama de compuestos y su alta capacidad de rendimiento. <sup>4</sup>

Las tecnologías que se utilizan principalmente para las investigaciones metabolómicas incluyen la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas-cromatografía de líquidos (EM-CL), espectrometría de masas-electroforesis capilar (EM-EC) y la espectrometría de masas-cromatografía de gases (EM-CG). Cada una de estas técnicas tiene ventajas y limitaciones (Ver tabla 1), y aún no está disponible una técnica analítica única para estudiar exhaustivamente el metaboloma. No obstante, el rápido desarrollo en instrumentación analítica y tecnologías de manejo de datos ha aumentado dramáticamente la capacidad de realizar un perfil extenso de metabolitos. <sup>4</sup>

			
<b>RMN</b>	<b>EM-CL</b>	<b>EM-CG</b>	<b>EM-EC</b>
<b>Ventajas</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis rápido y robusto</li> <li>• No requiere separación o derivatización</li> <li>• Detecta todos los grupos orgánicos</li> <li>• Número elevado de software y bases de datos para la identificación de metabolitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad excelente</li> <li>• Tecnología flexible y con potencial para detectar la mayor porción del metaboloma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad</li> <li>• Excelente capacidad de separación</li> <li>• Número elevado de bases de datos para la identificación de metabolitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad y potencia</li> <li>• Alta eficiencia de separación y rapidez</li> <li>• Requiere un volumen mínimo de muestra</li> </ul>
<b>Limitaciones</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad limitada</li> <li>• El instrumento ocupa mucho espacio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Robustez menor que RMN o EM-CG</li> <li>• Resolución cromatográfica menor que EM-CG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere compuestos volátiles o que se volatilicen mediante derivatización química</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja repetibilidad</li> <li>• Requiere compuestos volátiles</li> </ul>

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de las tecnologías analíticas más empleadas en metabolómica. <sup>4</sup>

## 1.1 Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectrométrico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias, de alrededor de 4 a 900 MHz, por parte de los núcleos de algunos átomos. Para que se formen en los núcleos los estados de energía que hagan posible la absorción, es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético. En la actualidad, los dos tipos generales de espectrómetros de RMN que se utilizan son el de onda continua y el de impulsos. Los primeros estudios se realizaron con los instrumentos de onda continua. Sin embargo, hacia 1970 se comercializaron los espectrómetros de impulsos y a la fecha son los que dominan el mercado. En los espectrómetros de impulsos la muestra se coloca en un potente campo magnético con una intensidad de varios teslas, la muestra se irradia con pulsos periódicos de energía de radiofrecuencia que son dirigidos a través de la muestra en sentido perpendicular al campo magnético, esta excitación por pulsos causa una señal en el dominio del tiempo que disminuye en el lapso entre los pulsos para posteriormente convertirse en una señal en el dominio de la frecuencia.<sup>5</sup>

Existen varios tipos de espectros de resonancia magnética nuclear, que dependen de: la clase de instrumento utilizado, del tipo de núcleo, del estado físico de la muestra, del entorno del núcleo del analito y del uso que se vaya a hacer de los datos. La mayoría de los espectros de RMN se clasifican como de línea ancha o de alta resolución, éstos últimos son los más utilizados y se obtienen mediante instrumentos capaces de distinguir diferencias de frecuencia muy pequeñas, del orden de 0.01 ppm o menores. Los espectrómetros de RMN de alta resolución son caros; su valor está entre 100,000 y un millón de dólares o más.<sup>5</sup>

Un aspecto único de los espectros de RMN es la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos causantes del surgimiento del pico. Entonces, la determinación cuantitativa de un compuesto específico no requiere muestras puras del compuesto para la calibración. Por consiguiente, si una resonancia identificable de uno de los constituyentes de una muestra no se traslapa con las resonancias de los otros componentes, se usa el área de este pico para establecer directamente la concentración de la especie, siempre que se conozca sólo el área de la señal por protón. Este último

parámetro se obtiene con facilidad a partir de la concentración conocida de un patrón interno. Por supuesto, la resonancia del patrón interno no debe traslaparse con ninguna de las resonancias de la muestra. A pesar de estas cualidades, la expansión de su uso para el análisis cuantitativo se detiene por el costo de los instrumentos. Además, la probabilidad de que las resonancias se traslapen se incrementa al aumentar la complejidad de la muestra y la RMN no es a menudo tan sensible ni tan conveniente como otras técnicas.<sup>5</sup>

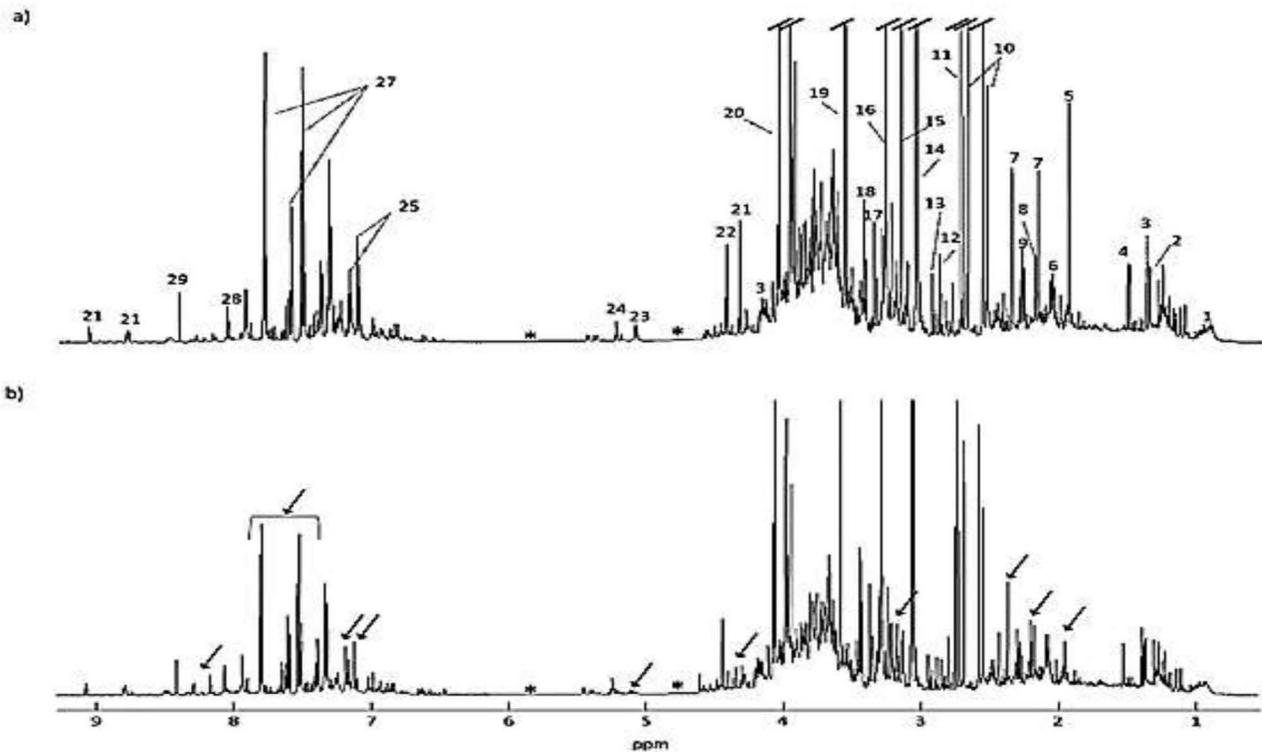


Figura 1. Espectros promedio de RMN de muestras de orina de (a) controles y (b) pacientes con carcinoma de células renales. Leyendas: (1) isoleucina, (2) treonina, (3) lactato, (4) alanina, (5) acetato, (6) glutamato, (7) *p*-cresol sulfato, (8) acetona, (9) valina, (10) citrato, (11) dimetilamina, (12) trimetilamina, (13) dimetilglicina, (14) creatina, (15) N-óxido de trimetilamina, (16) ácido 9-metil-úrico (asignación provisional), (17) metanol, (18) scyllo-inositol, (19) glicina, (20) creatina, (21) trigonelina, (22) trigonelinamida, (23) sin asignar (5.11 ppm), (24) glucosa, (25) indoxilsulfato, (26) fenilacetilglutamina, (27) hipurato, (28) hipoxantina, (29) formato. Las flechas indican alteraciones espectrales visibles. \*Regiones excluidas (agua y urea).<sup>6</sup>

La resolución de los espectros obtenidos *in vivo* es mucho menor y los picos de muchos metabolitos se superponen. Además, los espectros de tejidos contienen señales amplias proporcionadas por los núcleos de las partes externas de las macromoléculas o las de

macromoléculas más pequeñas con mayor movilidad. A pesar de estas limitaciones, los espectros obtenidos *in vivo* proporcionan información única sobre las concentraciones de metabolitos tisulares, que pueden diferir de la obtenida a partir de los extractos de tejidos.<sup>7</sup> Debido a la complejidad de muchos espectros se han realizado estudios metabólicos empleando los espectros bidimensionales para ayudar a solucionar problemas de superposición entre señales de muchos metabolitos.

La espectroscopia de RMN puede considerarse un método rápido y reproducible en la investigación metabólica. Mediante el uso de sondas de RMN de inyección de flujo, es posible analizar cientos de muestras en un día. La naturaleza no invasiva de la espectroscopia de RMN la convierte en una técnica ideal para estudios *in vivo*.<sup>8</sup> No obstante, también hay limitaciones en la RMN en los estudios metabólicos, incluyendo su sensibilidad relativamente baja (Ver tabla 2).<sup>9</sup>

Limitación	Problemas	Posibles soluciones
Baja sensibilidad comparada con EM-CL	Capacidad de detección: 1 nanomol sin hiperpolarización o en el rango de 10 picomoles con hiperpolarización para estudios cinéticos (en comparación con EM-CL, donde la detección de femtomoles ahora es rutinaria).	Hay varios enfoques para mejorar la sensibilidad. La opción más costosa es desarrollar una intensidad de campo magnético ultra alta, del orden 23-28 T. Sin embargo, el rendimiento de las sondas criogénicas y la estabilidad del campo magnético a una intensidad tan alta, es difícil y la mejora de la sensibilidad puede no aproximarse a la dependencia del campo teórico esperado. Las sondas criogénicas pueden proporcionar un aumento de la sensibilidad, típicamente 4 veces más que una sonda comparable para muestras sin pérdidas. Esto se ve muy comprometido en las muestras iónicas (con pérdidas), un problema que se exagera a una mayor intensidad de campo magnético. El uso de sondas de menor diámetro (por ejemplo, 1-1.7 mm) reduciría tales pérdidas, a la vez que mejora el rendimiento intrínseco, especialmente para muestras limitadas en masa. También se han desarrollado tubos con forma para reducir la influencia del campo magnético en las muestras ricas en sales.

<p>Resolución limitada (en términos del número de metabolitos comparando con la EM de alta resolución)</p>	<p>Aunque la detección de femtomoles ahora es rutinaria en EM-CL, la cantidad de material necesario para alcanzar este límite de detección es mucho mayor, ya que solo se puede introducir una pequeña fracción del eluido CL en el espectrómetro de masas.</p>	<p>Para expandir en gran medida la resolución 1D de RMN y obtener más información estructural, es indispensable un mayor desarrollo en RMN multidimensional, particularmente en términos de la velocidad de adquisición de datos. Se han desarrollado mejoras en este aspecto, incluidos el muestreo no uniforme y la proyección-reconstrucción. Otros enfoques hacia el hardware, incluyen los receptores múltiples que permiten la adquisición simultánea de dos o más experimentos 2D, así como métodos <i>one-shot 2/3D</i> que adquieren diferentes "incrementos" en diferentes segmentos de la muestra. Sin embargo, este último impone mayores exigencias a la sensibilidad.</p>
--	---	---

Tabla 2. Limitaciones y problemas actuales del perfilado metabolómico basado en RMN. <sup>9</sup>

## 1.2 Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas es un instrumento que produce iones a partir de una muestra y los separa de acuerdo con sus relaciones masa/carga,  $m/z$ . La mayor parte de los iones que se estudian tienen una sola carga, de modo que la relación es simplemente el número de masa del ion. Ahora ya se dispone comercialmente de varios tipos de espectrómetros de masas; tales como, espectrómetro de masas cuadrupolar, espectrómetro de masas de tiempo de vuelo y espectrómetro de masas de doble enfoque. <sup>5</sup>

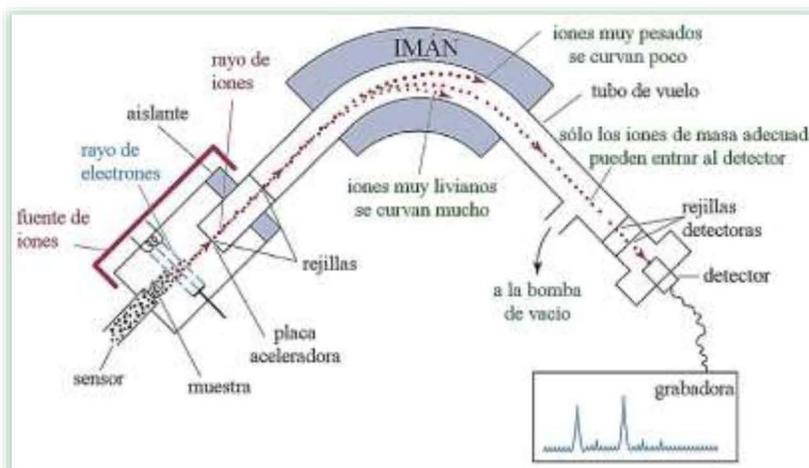


Figura 2. Esquema de un espectrómetro de masas. <sup>10</sup>

El equipo tiene un sistema de entrada cuyo objetivo es introducir una cantidad muy pequeña de muestra en la fuente de iones, donde los componentes de dicha muestra se transforman en iones gaseosos gracias al bombardeo con electrones, fotones o iones. Otra manera de lograr la ionización es aplicar energía térmica o eléctrica. La salida de la fuente de iones es un flujo de iones positivos, que es lo más común, o iones negativos gaseosos que son acelerados en el analizador de masas. En el analizador de masas, la dispersión depende de la relación masa-carga de los iones del analito y no de la longitud de onda de los fotones. El equipo contiene un transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada en la memoria de una computadora y mostrada en una pantalla o almacenada en otros medios. Los espectrómetros de masas requieren un complejo sistema de vacío para mantener una presión baja en todos los componentes, excepto en los sistemas para procesar la señal y de lectura. La presión baja asegura colisiones no frecuentes en el espectrómetro de masas para producir y conservar iones y electrones libres. Un análisis por espectrometría de masas consta de las etapas siguientes: 1) atomización, 2) conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones (casi siempre positivos de una sola carga), 3) separación de los iones formados en la segunda etapa con base en su relación masa/carga ( $m/z$ ), donde  $m$  es el número de masa del ion en unidades de masa atómica y  $z$  es el número de cargas fundamentales, y 4) conteo del número de iones de cada tipo o medición de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en un detector adecuado. Como la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga,  $m/z$  por lo regular es el número de masa del ion. Por lo regular, los datos que se obtienen con la espectrometría de masas se presentan en forma de una gráfica de intensidad relativa contra  $m/z$ .<sup>5</sup>

### 1.2.1 Sistemas acoplados a espectrometría de masas

Debido a que muchas muestras son impuras, por encontrarse en matrices biológicas complejas, como se explicó previamente en los espectros de RMN se llegan a empalmar las señales, entonces se puede optar por los sistemas acoplados, los cuales se mencionan en esta sección.

La espectrometría de masas acoplada a electroforesis capilar (EM-EC) es una potente plataforma metabolómica para los metabolitos iónicos, débilmente iónicos y altamente polares en fluidos biológicos (la mayoría de los metabolitos primarios son polares). Su ventaja es la separación eficiente de moléculas que permite la multiplexación para el análisis de alto rendimiento de las muestras, tiene un elevado poder de resolución y sensibilidad, requiere un volumen mínimo y puede analizar a alta velocidad.<sup>10</sup>

La espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos (EM-CL) es el método preferido para analizar los metabolitos semi-polares cuando se emplea una técnica de ionización suave (por ejemplo, ionización por electropulverización e ionización química a presión atmosférica). A menudo se emplean más disolventes polares para la extracción de metabolitos de muestras para analizar con EM-CL. La espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (EM-CG) requiere que se empleen metabolitos volátiles o que se vuelvan volátiles mediante derivatización previa. Una ventaja de la EM-CL en comparación con EM-CG es que las muestras se pueden recuperar más fácilmente después del fraccionamiento y que no se requiere una derivatización de la muestra. No obstante, las bibliotecas de EM-CL para identificación metabolitos no son tan fácilmente transferibles como lo son en EM-CG.<sup>4</sup>

A pesar de estos avances actuales, el estado del arte de la técnica de perfilado metabolómico basada en EM-CL todavía tiene algunas limitaciones y problemas que deben resolverse (Ver tabla 3).

Limitación	Problemas	Posibles soluciones
No es posible realizar el análisis del metaboloma entero	Los metabolitos presentes en muestras biológicas muestran diversidad de propiedades químicas y amplios rangos de concentración y pueden derivarse de muchas fuentes diferentes.	Los avances en la recolección de muestras (por ejemplo los métodos de extracción de metabolitos), los avances en las separaciones EM-CL y los avances en las características operativas cruciales de la EM; como los métodos de ionización, la sensibilidad, la resolución y la precisión de la masa, la velocidad de escaneo y las tasas de adquisición de datos.

<p>Baja compatibilidad entre los análisis de EM</p>	<p>Problemas con la combinación de datos desde diferentes análisis de EM, que retrasan la correlación de los datos obtenidos de diferentes instrumentos y laboratorios</p>	<p>Los avances en software para un uso más eficiente de los datos recopilados por las nuevas versiones de espectrómetros de masas y para la combinación de datos obtenidos de diferentes instrumentos y laboratorios.</p>
<p>Falta de protocolos estandarizados</p>	<p>Los estudios a gran escala deben superar la dificultad de los métodos de estandarización y el riesgo de desviaciones instrumentales, como las desviaciones del tiempo de retención causadas por el deterioro de la columna analítica o la inestabilidad de detección de EM causada por la contaminación de la fuente de iones. Además, ahora se sabe que los datos generados por EM para el perfilado global son muy complejos y contienen un alto porcentaje de ruido, y también que la mayoría de las características detectadas no corresponden a un único metabolito.</p>	<p>Los avances en el diseño específico de los protocolos de experimentación metabólica apropiados, con especial énfasis en la selección de controles y grupos de prueba; desarrollos analíticos para el control de calidad y validación (el uso de medidas de control de calidad es necesario para evaluar la estabilidad y la adecuabilidad de un sistema).</p>
<p>Software dedicado a la extracción de los datos</p>	<p>El software para la extracción de datos suele ser desarrollado por la misma compañía de instrumentos y ofrece una autonomía limitada para la optimización del proceso de extracción de datos. Repetir los análisis del mismo conjunto de muestra con diferentes configuraciones de software podría proporcionar cambios notables, pudiendo pasar inadvertido. El uso de software de código abierto permite una mayor flexibilidad, pero requiere de competencias más avanzadas en computación.</p>	<p>Las diferencias en el desempeño de varios programas informáticos (ya sea comerciales o de algoritmos de código abierto) utilizados para la extracción de datos deben evaluarse sistemáticamente.</p>

<p>Identificación de marcadores candidatos</p>	<p>Los espectros de EM-CL son muy variables: la formación de aductos y grupos no es controlable ni predecible. La fragmentación no es reproducible incluso en instrumentos del mismo tipo. Como resultado, las bibliotecas espectrales de EM-CL comerciales o de libre acceso siguen representando una solución aspiracional, en lugar de robusta, para la identificación de metabolitos desconocidos. En consecuencia, la anotación de metabolitos o la elucidación de la estructura <i>de novo</i> en matrices biológicas complejas requiere un esfuerzo y tiempo significativos.</p>	<p>La combinación de análisis de EM de alta resolución y herramientas avanzadas de informática se consideran las herramientas más prometedoras para la identificación de los marcadores candidatos. Para la anotación del metabolito (es decir, la asignación de un pico detectado a un metabolito conocido), las listas de candidatos se generan en función de la masa precisa detectada. Sin embargo, el proceso a partir de este punto no es sencillo, ya que el número de moléculas puede ser muy grande y diverso. La incorporación de datos independientes (ortogonales), como los datos de tiempo de retención, puede promover la identificación de los marcadores candidatos.</p>
<p>Análisis de rutas bioquímicas y desarrollo de herramientas relacionadas</p>	<p>Aun cuando los metabolitos son identificados, el análisis exhaustivo es mucho más complejo dadas las vías y los flujos metabólicos involucrados.</p>	<p>Los avances en el desarrollo de herramientas de análisis de rutas bioquímicas para buscar de manera efectiva en datos multidimensionales generados, aprovechando el conocimiento existente (por ejemplo, bases de datos públicas como la HMDB, la KEGG y los mapas de lípidos) para crear asociaciones entre las señales recopiladas (tales iniciativas incluyen <i>MGI Genome</i> y <i>MassTrix</i>); la incorporación de datos de vías conocidas puede contribuir a la identificación de marcadores candidatos, localizando señales (picos) que representan metabolitos faltantes en vías semi-descrietas o desconocidos repetidos (es decir, picos que se observan con frecuencia pero no se identifican o picos cuya identificación como candidatos no se ha confirmado).</p>

Tabla 3. Limitaciones y problemas actuales del perfilado metabolómico basado en EM-CL.<sup>11</sup>

## 2. Estrategias experimentales y análisis bioinformáticos

Los estudios metabolómicos como cualquier estudio científico requieren llevar a cabo una planificación cuidadosa del flujo de trabajo, para obtener resultados que sean confiables y reproducibles. Los cuatro pasos generales en un estudio de metabolómica son: la recolección o generación de muestras, la obtención de datos, el análisis bioinformático y la interpretación. Una vez que se completen estos cuatro pasos, es posible formular una hipótesis basada en los resultados o probar los biomarcadores recién descubiertos en estudios adicionales. Durante la obtención de datos es fundamental mantener un estricto control de calidad, así como seguir procedimientos estandarizados para obtener resultados reproducibles que aseguren la generación de datos metabolómicos confiables y que puedan utilizarse para hacer comparaciones inter laboratorios.<sup>12</sup> En el año 2005, los principales expertos en metabolómica, con el apoyo de la *Metabolomics Society*, se reunieron para discutir los estándares experimentales de metabolómica y formaron la iniciativa de estándares de metabolómica (MSI). Dos años más tarde, la MSI publicó en la revista *Metabolomics* una serie de estándares reportables en informes de metabolómica<sup>13</sup>, con muestras *in vivo*<sup>14</sup>, análisis químicos<sup>15</sup>, metabolómica basada en RMN<sup>16</sup> y análisis de datos.<sup>17</sup>

A continuación se mencionan de manera general los aspectos importantes para llevar a cabo las cuatro etapas en un estudio de metabolómica.

### 2.1 Recolección de muestra

El primer paso antes de la recolección de las muestras es la elección y el reclutamiento de los sujetos de estudio. Es necesario elegir a las poblaciones control más adecuadas para minimizar las variaciones que surgen por género, edad, origen étnico y factores de estilo de vida como el uso de drogas y alcohol.<sup>12</sup> La primera etapa en un estudio de metabolómica consiste en la recolección, el almacenamiento y la preparación de las muestras. Cuando sea posible (para las muestras más empleadas que son la orina, el suero y el plasma), las muestras deben almacenarse en múltiples alícuotas justo después de la recolección. Se prefiere el uso de múltiples alícuotas para evitar los artefactos generados a partir de múltiples ciclos de congelación/ descongelación en los análisis de metabolómica múltiple.<sup>12</sup>

Las opciones empleadas frecuentemente para el almacenamiento de las alícuotas son tubos Eppendorf Safe-Lock de 1.5 mL o tubos Falcon cónicos estériles de 15 y 50 mL. Las muestras fecales humanas, se almacenan en un rango de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de la preparación de la muestra. El almacenamiento de muestras es un paso crucial y sensible. Los ciclos de congelación y descongelación deben minimizarse para evitar la posible degradación de los metabolitos. La selección de un método de extracción es bastante desafiante y depende del objetivo del análisis y la elección de una técnica analítica. Además, este paso es crucial para obtener una buena tasa de extracción de metabolitos, es decir, para obtener un número máximo de metabolitos cuantificables mientras se evita su posible alteración física y química. El apagado metabólico en la muestra puede lograrse mediante el cambio repentino de pH o temperatura. A veces es necesario concentrar la muestra después del procedimiento de extracción debido a que la baja cantidad de metabolitos se puede diluir en un volumen relativamente grande de solvente de extracción. La espectroscopia de RMN generalmente se beneficia de la preparación mínima de la muestra y la falta de efectos de supresión entre los metabolitos, lo que permite una investigación paralela de diferentes matrices de muestra y la naturaleza cuantitativa del análisis. A diferencia de los fluidos biológicos como el plasma y la orina, donde no es necesaria la extracción y la adición de una solución amortiguadora es suficiente, el análisis de las heces o el contenido luminal intestinal requiere la eliminación de material no digerido, bacterias muertas y otras partículas sólidas. Los extractos fecales para la RMN se preparan principalmente con agua o metanol. <sup>18</sup>

## 2.2 Obtención de datos

### 2.2.1 Análisis de las muestras

El análisis de las muestras involucra la elección de la técnica en función del tipo de muestra, la pregunta y el presupuesto del laboratorio. Las ventajas y limitaciones de ambas técnicas de RMN y EM se han mencionado previamente y ambas son capaces de proporcionar datos superpuestos pero complementarios. La combinación de múltiples técnicas en un conjunto de muestras proporciona el método más poderoso para revelar cambios en el metaboloma. De manera general los experimentos se diseñan considerando casos y controles para encontrar metabolitos que sean indicativos de la condición a estudiar. <sup>12</sup>

## 2.2.2 Control de calidad

Una vez obtenidos los datos metabolómicos, es necesario realizar el control de calidad para optimizar la reproducibilidad de los datos generados y proporcionen resultados significativos; en experimentos de metabolómica, la mayoría de los estudios son de casos y controles, por lo que el diseño experimental requiere la identificación inicial de una muestra de cohorte adecuada, esto es, que los grupos de casos y de controles difieran únicamente con respecto a la variable de agrupación, y que presenten distribuciones similares en cuanto a factores fundamentales demográficos y biométricos como la edad, el género o el IMC, debido a que tales factores influyen mucho en las características del grupo. En los casos en que las muestras ya se tienen previamente y no es necesario el reclutamiento de sujetos, debe asegurarse que de manera retrospectiva se equilibren las cohortes, tomando en cuenta (aun cuando conlleve complejidad adicional) cualquiera de los factores que podría ya haber afectado las muestras de antemano (por ejemplo, el número de ciclos de congelación/descongelación, la edad de la muestra, la forma en que se almacenaron las muestras).<sup>3</sup> La normalización es el paso más común para preparar el pre-procesamiento de datos, tiene por objetivo permitir la comparación directa para el perfil metabolómico. Se seleccionan un conjunto representativo de picos de cada conjunto de datos. Los conjuntos de picos de metabolitos clave pueden alinearse aún más en lugar de utilizar todos los picos de los conjuntos de datos. Se evalúan los parámetros de una función de cambio de tiempo basados en la función matemática para modelar el tiempo de retención o los cambios de tiempo de migración entre las muestras aplicando la combinación de optimización global y programación dinámica. Comúnmente, los datos de EM tienen algunos problemas habituales que deben considerarse, es decir, la desviación de la línea de base, los cambios en el tiempo de retención, el ruido y los artefactos. En general, la calidad de los datos metabólicos específicos puede evaluarse seleccionando una cantidad de compuestos representativos para cada categoría de metabolitos y calculando su concentración en relación con los estándares internos elegidos adecuadamente. Por otro lado, el pre-procesamiento de los datos crudos de RMN generalmente se realiza mediante el software de corrección de la fase y la línea de base, la eliminación de agua y la resonancia de urea, y la agrupación o agrupación espectral. Para ambas técnicas basadas en EM y en RMN, la normalización se puede hacer con base en la suma o área total del pico, con un compuesto de referencia (creatinina como estándar interno), con una muestra de referencia que

también se conoce como "normalización del cociente probabilístico", la masa seca, el volumen, etc.<sup>19</sup> Por último, cabe señalar la importancia que tienen las calibraciones de los espectrómetros de masas y de resonancia magnética nuclear, así como la validación de los métodos analíticos involucrados en el estudio metabólico.

### 2.3 Procesamiento de datos y bioinformática

Una vez que se han identificado los metabolitos, el tercer paso es el análisis estadístico y bioinformático. Los datos se procesan previo al análisis estadístico utilizando un software especializado en bioinformática que usualmente es el que proporciona el proveedor de la plataforma tecnológica empleada, aquí se utilizan métodos para ajustar la variación entre muestras (normalización), para amortiguar el efecto de los metabolitos con abundancias extremadamente grandes (transformación) y para ajustar individualmente las diferencias de pliegues entre metabolitos (escalado).<sup>3</sup>

El análisis de componentes principales (PCA) suele ser el primer tipo de enfoque estadístico utilizado. El PCA generalmente se aplica inicialmente para describir los datos en función de nuevas variables no correlacionadas, con la finalidad de buscar patrones relacionados con el punto final que se está estudiando o para determinar si hay valores atípicos. La organización en grupos (o *clustering*) es un método que tiene como objetivo agrupar los datos de acuerdo con sus propiedades. Los elementos (por ejemplo, muestras o metabolitos) que se agrupan juntos o en el mismo grupo son más similares entre sí que los elementos de otros grupos. Estos métodos muestran una agrupación natural de los datos y ayudan a visualizar y revelar patrones de los datos. El mapa de auto-organización (SOM) es un tipo de red neuronal que se aplica para visualizar datos de alta dimensión en el espacio de baja dimensión (normalmente dos dimensiones). Mientras que el PCA usa una proyección lineal para reducir la dimensión de los datos, SOM aplica un reconocimiento de patrones no lineales más complejo. Su objetivo es encontrar una representación de baja dimensión de los datos de entrada. Las muestras, que son similares entre sí, se colocan en una región similar. En metabolómica, por ejemplo, SOM se lleva a cabo para visualizar los cambios metabólicos en el cáncer de mama desde el tejido normal hasta diferentes grados de tumores. SOM tiene la ventaja de proporcionar un mapeo no lineal para la visualización

de datos. Sin embargo, el algoritmo es como una "caja negra". Los metabolitos clave usados para la separación están ocultos, lo que no es útil para la interpretación funcional.<sup>19</sup>

Después del análisis estadístico seleccionado, se pueden emplear muchos otros tipos de métodos de análisis de datos supervisados y otros métodos estadísticos para la minería de datos en la búsqueda de biomarcadores. Los modelos supervisados pueden relacionarse con puntajes de histopatología del cáncer, resultados clínicos u otros datos "ómicos" para impulsar el proceso de descubrimiento de biomarcadores. Una vez que se crean modelos a partir de datos de perfiles abiertos y se identifican posibles características espectrales como biomarcadores, se intenta la identificación positiva de los biomarcadores espectrales desconocidos. Identificar los biomarcadores desconocidos en la metabolómica no dirigida es la parte más difícil porque se desconoce la identidad de muchos picos espectrales. Las bases de datos espectrales internas y las bases de datos metabólicas públicas como la base de datos del metaboloma humano (HMDB), las bases de datos Golm, Metlin, Mapps Lipid y otras bases de datos espectrales se pueden usar para ayudar a identificar los picos.<sup>12</sup>

Con la creciente generación de datos de metabolómica, surge una necesidad urgente de herramientas de software de código abierto y que sean fáciles de usar, capaces de analizar conjuntos de datos cada vez más grandes y complejos. La naturaleza del software de código abierto promueve la transparencia y la reproducibilidad en el análisis de datos, así como también fomenta la colaboración académica al permitir que diferentes grupos de investigación amplíen aún más las herramientas existentes o las incorporen en nuevos canales de software. Existe una amplia variedad de herramientas web o basadas en Galaxy para el análisis de datos metabólicos, como MetaboAnalyst, XCMSOnline, Workflow4Metabolomics y Galaxy-M. Entre ellos, MetaboAnalyst es una de las herramientas más utilizadas para el análisis estadístico y funcional de datos metabólicos.<sup>20</sup>

A pesar de su facilidad de uso, la interfaz web ha presentado sus limitaciones inherentes (especialmente para usuarios avanzados) con respecto a la flexibilidad en la creación de un flujo de trabajo personalizado, soporte para análisis reproducibles y capacidad para tratar grandes cantidades de datos. Para abordar estas limitaciones, fue desarrollado un paquete complementario R (MetaboAnalystR) basado en el código R del servidor web. El paquete se ha analizado exhaustivamente para garantizar que los mismos comandos R produzcan

resultados idénticos desde ambas interfaces. MetaboAnalystR complementa el servidor web MetaboAnalyst para facilitar un análisis transparente, flexible y reproducible de los datos de metabolómica. <sup>20</sup>

En la actualidad se encuentran disponibles varias plataformas de procesamiento de datos metabolómicos basados en la web; XCMSOnline proporciona una plataforma basada en XCMS para el análisis de datos en sentido descendente, la visualización, el intercambio de datos y el acceso a Metlin para facilitar la identificación de metabolitos y el análisis de rutas. MetaboAnalyst presenta una amplia variedad de herramientas de análisis y procesamiento de datos que incluyen análisis estadístico, análisis de series de tiempo, análisis funcional y análisis de rutas. Workflow4Metabolomics se basa en Galaxy y proporciona varios flujos de trabajo de procesamiento metabolómico, incluida la RMN. Estas herramientas comunes para analizar datos metabólicos proporcionan interfaces gráficas de usuario basadas en la web con diferentes funcionalidades. <sup>21</sup>

PhenoMeNal (*Phenome and Metabolome aNalysis*) es una solución avanzada y completa para configurar “Infraestructura como servicio” (IaaS, por sus siglas en inglés) que trae a la nube plataformas de análisis de datos de metabolómica interoperables orientadas al flujo de trabajo. PhenoMeNal integra eficientemente una amplia gama de herramientas de código abierto existentes que se prueban y empaquetan como contenedores Docker a través del proceso de integración continua del proyecto y se implementan con base en un marco de orquestación de kubernetes. También proporciona una serie de flujos de trabajo de análisis estandarizados, automatizados y publicados en las interfaces de usuario Galaxy, Jupyter, Luigi y Pachyderm. <sup>21</sup>

PhenoMeNal constituye una solución completa en las infraestructuras electrónicas en la nube disponibles para metabolómica, a través de interfaces web fáciles de usar que se pueden escalar a cualquier entorno de nube público y privado. Al armonizar y automatizar la instalación y configuración del software y a través de interfaces de usuario de flujo de trabajo listas para usar, PhenoMeNal ha logrado proporcionar plataformas de análisis de datos metabolómicos, reproducibles y compatibles, que se interconectan a través de formatos de datos estándar, conjuntos de datos representativos y versiones probadas para su reproducibilidad e interoperabilidad. <sup>21</sup>

## 2.4 Interpretación y validación

En la interpretación funcional de los datos metabolómicos, los metabolitos candidatos a utilizar como biomarcadores, se colocan en un contexto biológico de vías o redes metabólicas, con el fin de alcanzar la comprensión biológica y una interpretación relevante. Para este propósito se utilizan dos enfoques principales, que son el análisis de enriquecimiento y el mapeo y visualización de vías.<sup>19</sup>

En conjunto con los análisis de interpretación funcional mencionados, es importante hacer un seguimiento con estudios basados en hipótesis o estudios de verificación de los biomarcadores. Muchas veces estos estudios de hipótesis y validación utilizan metabolitos marcados como la glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  para verificar que el flujo a través de vías metabólicas específicas haya ocurrido en un período de tiempo específico. Los flujos de la glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  se han evaluado en el cáncer de páncreas, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón, así como para controlar las vías de glucosa durante la intervención médica contra el cáncer. Para evaluar la reproducibilidad y la varianza entre los biomarcadores, la validación debe realizarse en laboratorios de metabolómica separados; en los estudios de seguimiento, es importante centrarse en el "contexto de uso" en el que se evaluará el biomarcador metabolómico. Este proceso se conoce como calificación de biomarcadores y tiene la intención de establecer la utilidad de un biomarcador dentro de un "contexto de uso", por ejemplo, qué tan sensibles y específicos son los biomarcadores de diagnóstico o pronóstico del cáncer durante la terapia farmacológica para el cáncer.<sup>19</sup>

### 3. Aplicaciones

La metabolómica puede tener muchas aplicaciones en biomedicina ya que los metabolitos son el resultado directo de los procesos bioquímicos que se están llevando a cabo dentro de una célula o tejido. Pueden contener metabolitos particulares para la condición que se está analizando y brindar información acerca de una condición o respuesta a un fármaco. Es por ello que una de las principales aplicaciones es el descubrimiento de biomarcadores que permitan caracterizar una condición o la respuesta a un fármaco. Un biomarcador en este contexto es un metabolito que es indicador de un estado biológico y que puede medirse de manera objetiva. Los biomarcadores validados en la investigación clínica o en estudios de la salud poblacional pueden formar la base para nuevas pruebas de diagnóstico y abrir el camino para ayudar a establecer la medicina de precisión. La falta de biomarcadores adecuados actualmente frena una mayor implementación de la medicina personalizada. Aquí es donde la metabolómica establece un enfoque clave para descubrir un biomarcador, probar su detección en una población grande y diversa y luego traducir su detección en métodos más económicos, más rápidos y confiables que podrían ser utilizados por un mayor número de personas. <sup>22</sup>

Existen diferentes tipos de biomarcadores que pueden definirse de acuerdo a su aplicación y que se describen a continuación:

- A. Candidatos, son características que consisten en componentes biológicos medibles (metabolito o panel de metabolitos) que tienen potencial de indicar específicamente ciertos estados de enfermedad, las respuestas a tratamientos terapéuticos u otros estados biológicos relevantes.
- B. Biomarcadores de riesgo que identifican a los pacientes con probabilidades de desarrollar determinadas enfermedades.
- C. Biomarcadores de diagnóstico, para la detección del estado temprano de la enfermedad, clasificación en subtipos de enfermedad o caracterización de la respuesta al tratamiento.
- D. Biomarcadores pronósticos, para la predicción de la progresión de la enfermedad, la predicción de la recurrencia de la enfermedad o la identificación de pacientes que puedan responder a un tratamiento.

Actualmente se encuentran kits disponibles comercialmente que incluyen paneles de metabolitos para su uso solo en investigación, algunos de ellos se enlistan a continuación:

Fabricante	Kits para uso en investigación
Biocrates Life Sciences AG	AbsoluteIDQ® p180 Kit
	AbsoluteIDQ® p400 HR Kit
	MxP® Quant 500 Kit
	Biocrates® Bile Acids Kit
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Bio-Plex Pro™ Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor
	Bio-Plex Pro™ Human Inflammation
Metabolon, Inc.	Meta IMD™
	Complex Lipid Panel™
IROA Technologies™	IROA TruQuant IQQ™
Sigma-Aldrich, Inc.	LOPAC®1280

Tabla 4. Algunos kits de metabolómica que se encuentran disponibles en el mercado.

En términos generales, las investigaciones de metabolómica centradas en enfermedades humanas se pueden agrupar en tres categorías:

- a) Comprensión de las bases moleculares de la patogénesis de las enfermedades e identificar vías metabólicas alteradas. <sup>23</sup>
- b) Identificación de biomarcadores de metabolitos para clasificar las enfermedades con alta sensibilidad y especificidad. Estos estudios están aumentando exponencialmente debido a la urgente necesidad de descubrir biomarcadores sensibles que puedan mejorar el diagnóstico de la enfermedad, principalmente biomarcadores de cáncer (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama basados en investigaciones de metabolitos del tejido mamario); biomarcadores de cáncer de próstata apoyados en niveles bajos de concentración de citrato; biomarcadores de carcinoma de ovario, incluidos aquellos involucrados en el metabolismo de las purinas, pirimidina y glicerolípidos; biomarcadores de

cáncer de colon que incluyen lactato, piruvato, ácido málico y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; biomarcadores de cáncer de pulmón que utilizan muestras diferentes como la orina, el aire exhalado condensado o el sudor.<sup>23</sup>

c) Búsqueda de oportunidades de traslación y aplicaciones en metabolómica. Estas investigaciones aún son muy pocas, debido a su complejidad. En la figura 3 se indican los cinco pasos principales en el camino de trasladar un biomarcador de diagnóstico a la clínica. El último paso de la comercialización también puede incluir su propio proceso de desarrollo y muchos de los otros pasos pueden tener múltiples iteraciones, lo que complica un poco el proceso. También se debe indicar que este proceso no es unidireccional, pero que en la práctica, los pasos posteriores pueden informar procesos anteriores y dicha retroalimentación puede usarse para mejorar el proceso general. Por ejemplo, los resultados de la pre-validación pueden mostrar que se necesita un descubrimiento adicional de biomarcadores o que el desarrollo de un candidato a biomarcador en particular es difícil, lo que sugiere que se debe usar otro modelo que incluya una combinación diferente de biomarcadores en la etapa de pre-validación.<sup>24</sup>



Figura 3. Los pasos principales involucrados en la traslación del laboratorio hacia la clínica de un candidato a biomarcador. En la práctica, algunos pasos pueden combinarse, como Descubrimiento y Pre-validación, o puede haber varios pasos de Validación. Normalmente el paso de desarrollo precede al paso de validación final, seguido por el proceso de comercialización que puede tomar varias formas y ofrecerse en una o más plataformas.<sup>24</sup>

Hay varias maneras en que las mediciones de biomarcadores pueden ayudar en el desarrollo y evaluación de terapias novedosas. Durante las investigaciones iniciales de candidatos terapéuticos en humanos, los biomarcadores pueden proporcionar una base para la selección de compuestos líderes en ensayos clínicos de fase 3. Los biomarcadores contribuyen al conocimiento sobre la farmacología clínica y proporcionan una base en el diseño de ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la eficacia de forma expedita y definitiva. Los biomarcadores proporcionan información para orientación en la dosificación y minimizan la variación interindividual en la respuesta. Los biomarcadores que representan

indicadores altamente sensibles y específicos de las vías de la enfermedad se han utilizado como sustitutos de los resultados en los ensayos clínicos cuando la evidencia indica que predicen el riesgo o beneficio clínico. La evaluación de los beneficios y riesgos debe ser el objetivo del plan de desarrollo para todas las intervenciones terapéuticas. La forma más confiable de evaluar el impacto clínico de una intervención terapéutica (por ejemplo; fármaco, dispositivo, cirugía, vacuna, agente biológico y modalidad conductual) es a través de su efecto en un punto final clínico bien definido como: supervivencia, infarto de miocardio, evento cerebrovascular, fractura de hueso o recurrencia de cáncer. Sin embargo, esta norma puede ser poco práctica para la evaluación de algunas terapias a largo plazo para la enfermedad porque se requieren largos períodos de tiempo para alcanzar estos criterios de valoración clínicos y se necesitan ensayos con un gran número de pacientes para su evaluación. Los biomarcadores que pueden ser sustitutos confiables de las respuestas clínicas tienen el potencial de mejorar la eficiencia de los ensayos clínicos en los que se evalúan las intervenciones a largo plazo de la enfermedad. Los biomarcadores pueden ser sustituidos de forma fiable por las respuestas clínicas. En otros casos, los biomarcadores confiables se han utilizado como sustitutos de los puntos finales clínicos en situaciones de toma de decisiones cuando un resultado clínico devastador, como la muerte, representa un dilema ético. Este punto se ha estado ilustrando en estudios farmacocinéticos en los que se utilizaron biomarcadores tales como la carga viral en plasma y los recuentos de células CD4 como sustitutos de los resultados clínicos (por ejemplo, muerte y ocurrencia de infecciones oportunistas) en la evaluación del estudio de agentes antivirales en pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana.<sup>25</sup>

Indirectamente, los metabolitos afectan el entorno en el que se producen. En condiciones normales, existen controles homeostáticos para contrarrestar cualquier consecuencia biológica adversa de tales efectos. Por ejemplo, los metabolitos ácidos disminuyen el pH del microentorno y se encuentran altas concentraciones de estos metabolitos ácidos, por ejemplo en el colon, debido a la fermentación bacteriana de hidratos de carbono de la dieta que conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, estos se neutralizan de manera eficiente por la producción de bicarbonato en la mucosa. Cabe destacar que estos controles homeostáticos pueden verse comprometidos con la edad y durante la enfermedad, lo que lleva a un deterioro funcional y a la dificultad para volver a un estado estable. Inclusive la adaptación de las células cancerosas glucolíticas aberrantes a

las grandes cantidades de lactato y protones que ellas mismas producen, ocurre mediante la modificación de la actividad de los transportadores, intercambiadores, bombas y anhidrasas carbónicas, ayudando a mantener el pH intracelular y permitiendo que las células sobrevivan en el microentorno ácido. <sup>26</sup>

Aunque se han hecho avances significativos en el área durante más de una década, aún no es posible nombrar un biomarcador resultante de la metabolómica, que sea utilizado rutinariamente en el campo clínico, aparte de los que han sido empleados durante muchos años en pruebas clínicas típicas (creatinina o glucosa en sangre; ácido úrico, cloruro, amoníaco, creatina o glucosa en orina). Esta situación puede explicarse por la falta de validación analítica y los pasos subsecuentes hacia la implementación clínica. Debido a los avances tecnológicos en el área, la metabolómica ha podido incorporar áreas más específicas como son la lipidómica y glucómica, que a continuación se describen. Debido a su importancia y gran potencial en la práctica clínica, se considera que tienen un papel relevante en la implementación de la medicina personalizada. <sup>27</sup>

### 3.1 Lipidómica

Los lípidos son componentes cruciales de las membranas celulares y partículas lipídicas como las lipoproteínas. Los lípidos desempeñan roles esenciales en las funciones celulares, incluidas las barreras celulares, las matrices de membrana, la señalización y los depósitos de energía. Los lípidos celulares también son altamente dinámicos, porque están cambiando constantemente con las condiciones fisiológicas, patológicas y están implicados en varias vías metabólicas. La lipidómica surgió en 2003 y ha avanzado mucho en los últimos años, en gran parte debido al desarrollo de la espectrometría de masas. <sup>28</sup>

La lipidómica puede definirse como el estudio a gran escala de las especies lipídicas y sus redes relacionadas y vías metabólicas que existen en las células o en cualquier otro sistema biológico. Su objetivo es la caracterización, identificación y cuantificación completas de las especies de lípidos moleculares y sus funciones biológicas con respecto a la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo y función de los lípidos, incluida la regulación de genes. Los lípidos como componentes fundamentales de las membranas biológicas, forman una clase de moléculas diversas tanto estructuralmente como funcionalmente. Dependiendo

de la biosíntesis y la estructura química, éstos son hidrofóbicos o anfifílicos. Los lípidos anfifílicos existen en vesículas, membranas o liposomas en un medio acuoso. Los lípidos biológicos originan dos tipos distintos de subunidades bioquímicas: los grupos isopreno y cetoacilo. De acuerdo con esta definición, los lípidos se pueden dividir en ocho categorías: acilos grasos, glicerolípidos, esfingolípidos, glicerofosfolípidos, sacarolípidos, lípidos de esterol, lípidos de prenol y policétidos. Además de proporcionar información sobre las funciones específicas de las especies de lípidos en la salud y enfermedad, la lipidómica también identificará biomarcadores potenciales para establecer programas preventivos o terapéuticos. Los biomarcadores basados en lípidos ofrecen nuevas oportunidades para la medicina de precisión al proporcionar herramientas de diagnóstico sensibles para la predicción y el monitoreo de enfermedades. La aplicación de la lipidómica en estudios clínicos puede proporcionar nuevos conocimientos sobre el perfil de los lípidos y los mecanismos fisiopatológicos.<sup>29</sup>

La lipidómica no solo investiga el almacenamiento de energía química y los cambios en los patrones de fosfolípidos de la membrana celular externa, sino que también examina los cambios en los niveles intracelulares de moléculas mensajeras de los grupos de eicosanoides, prostaglandinas y diacilgliceroles, ácidos grasos como el ácido araquidónico o el ácido eicosapentaenoico, lisofosfolípidos, inositol 1,4,5-trifosfato y del amplio campo de los esteroides y esteroles. Con este enfoque los lípidos se pueden considerar como fenotipos intermedios que se acercan más al estado de la enfermedad en cuestión, en comparación con la información genética. Por lo tanto, es posible que se revelen asociaciones fuertes entre las especies de lípidos moleculares y los estados patológicos con conjuntos de muestras relativamente pequeños, en comparación con los estudios de asociación genética. Otra área potencial de aplicación de biomarcadores lipidómicos es la identificación de biomarcadores de eficacia de medicamentos y soluciones de diagnóstico complementarias. Actualmente, algunas compañías farmacéuticas están estableciendo diferentes inhibidores de la pro-proteína convertasa subtilisina/ kexina Tipo 9 por el reconocimiento que han tenido estos nuevos compuestos como potentes fármacos hipolipemiantes. En psiquiatría y neurología, surgen dificultades para desarrollar biomarcadores, debido a la falta de acceso directo a los tejidos afectados. La metabolómica, con el estudio de los metabolitos de las enfermedades del SNC, es útil para explicar numerosos aspectos: información sobre los mecanismos de la enfermedad, identificación

de pronósticos, diagnósticos y marcadores sustitutos de un estado de enfermedad, la capacidad de subclasificación de la enfermedad basada en perfiles de metabolitos, identificación de biomarcadores para los fenotipos de respuesta a fármacos y para aquellos que desarrollan metabolitos relacionados con las reacciones adversas (farmacometabolómica), así como la adición de datos importantes en los procesos de desarrollo y descubrimiento de nuevos medicamentos. En cuanto a los fármacos hipolipemiantes, como las estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A), que son de primera línea para el tratamiento de la hipercolesterolemia; la evaluación de su seguridad y eficacia se basa en las mediciones de la concentración de lípidos en la sangre, por lo tanto expandiéndose hacia la lipidómica funcional. El anabolismo y el catabolismo de los lípidos son un importante integrador molecular de la homeostasis energética y la estructura dinámica de la membrana, mientras que la señalización con desequilibrios en el metabolismo de los lípidos contribuye a diversos fenotipos y estados patológicos. Para la intervención terapéutica en enfermedades, que van desde la inflamación y el cáncer hasta las enfermedades metabólicas, los investigadores de lípidos están buscando reguladores específicos de muchas dianas, incluyendo las fosfatidilinositol-3-cinasas, esfingosina y ceramida cinasas, los receptores nucleares de hormonas (por ejemplo, receptores X del hígado, receptores activados por proliferadores de peroxisomas).<sup>29</sup>

Se enlistan a continuación aplicaciones de la lipidómica en biomedicina:

Aplicación	Tipo	Implicaciones y hallazgos
Síndrome metabólico	Enfermedad cardiovascular	Nuevos conocimientos sobre la asociación de lípidos moleculares con ECV, nuevo enfoque de la estratificación del riesgo para EAC inestable, desentrañar la heterogeneidad lipídica dentro de las lesiones ateroscleróticas, revelando biomarcadores de aterosclerosis, comprensión del factor de riesgo de obesidad en ECV, identificación de marcadores de riesgo lipidómico y metabólico de ECV.
	Enfermedades inflamatorias (por	Comprensión de los mecanismos de las enfermedades inflamatorias, identificación de metabolitos bioactivos con propiedades

	ejemplo, aterosclerosis)	antiinflamatorias potentes y mediadores de lípidos en la promoción y resolución de la inflamación, eicosanoides en la infección e inflamación.
	Terapias basadas en lipoproteínas de alta densidad en enfermedad vascular aterosclerótica	Ampliando el conocimiento sobre las enfermedades cardiovasculares y metabólicas; posibles mecanismos de la función ateroprotectora de la fosfatidilserina asociada a HDL, aplicaciones potenciales de fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente en terapias basadas en HDL.
	Diabetes y obesidad	Mejora del rendimiento de los modelos de clasificación, asociación positiva de lípidos plasmáticos con obesidad, asociación de lipidoma plasmático con diabetes tipo 2 y asociación similar presente en la prediabetes; nuevos conocimientos sobre mecanismos, la fisiología y fisiopatología de los islotes y las etiologías de la diabetes, explorar la relación del análisis metabolómico en la investigación del desarrollo de la diabetes en niños y los cambios en niños obesos con pérdida de peso.
Enfermedades neurológicas	Enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedad de Huntington	Alteraciones en los fosfolípidos, aumento de los niveles de diglicéridos y otros; ésteres reducidos de colesterol; mediadores lipídicos cambiados, factores activadores de plaquetas como posibles biomarcadores en la inflamación y la neurodegeneración.
Cáncer	Cáncer de mama, de próstata, pulmón, ovario, esófago, riñón, piel	Un panel de lípidos como biomarcadores, acumulación de ésteres de colesterol, elongación de la cadena acilo, fosfolípidos modificados, el papel de la ciclooxigenasa-2 en la oncogénesis.
Enfermedades de los ojos	Visión	Aplicación en oftalmología e investigación ocular.
	Análisis lagrimal en enfermedades de la superficie ocular	Revelando aberraciones lipídicas específicas de la estructura en el síndrome del ojo seco.

	Secreción de la glándula de Meibomio y película lagrimal en la protección de la superficie ocular	Encontrar marcadores confiables de enfermedades oculares, identificación del papel fisiológico de los lípidos meibomianos y los objetivos más relevantes para futuros estudios biomédicos oculares.
	Inflamación y neuroprotección	Definición de las acciones del DHA y su derivado neuroprotector para la intervención en enfermedades oculares neurodegenerativas, caracterización de fosfolípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados para una mejor comprensión de la patogénesis en las membranas de los fotorreceptores, localización de lípidos dentro de secciones de retina, terapia basada en lípidos.
Nutrición	Intervención dietaria	La nutrición excesiva a corto plazo influye en los lípidos plasmáticos de humanos sanos; los lípidos plasmáticos utilizados como sustitutos de la ingesta dietética promueven una asociación negativa entre el consumo de alimentos lácteos y el riesgo de diabetes tipo 2 en individuos con síndrome metabólico, respuesta a la ingesta dietética baja en colesterol, respuesta metabólica a la dieta de restricción calórica, transporte lipídico dietético y señalización, lípidos dietéticos en la regulación de la inmunidad intestinal, identificación de nuevos biomarcadores en epidemiología nutricional.
	Beneficios que aportan a la salud los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la dieta	Análisis de mediadores bioactivos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la dieta para investigar los mecanismos moleculares subyacentes a sus beneficios para la salud o los efectos de controversia; incorporación de DHA nutricional en el tejido.

Investigación y desarrollo de fármacos	Descubrimiento de moléculas, fármacos candidatos, pruebas preclínicas/clínicas, toxicidad, biomarcadores, medicina personalizada	Diagnóstico complementario en varios pasos en el proceso de desarrollo de medicamentos; utilidad en el estudio de los mecanismos de acción de la medicina tradicional china; potencial de los inhibidores de la lipogénesis <i>de novo</i> como fármacos contra el cáncer, biomarcadores lipídicos para evaluar la eficacia del fármaco, lipidómica plasmática en el descubrimiento de fármacos cardiovasculares.
Medicina personalizada y multi-ómicas	Diabetes tipo 1, asma, dolor crónico, metabolismo global de lípidos, medicina de sistemas y dinámica, efectos de la dieta	El modelado metabólico como una nueva vía para la interacción del sistema inmune en la diabetes tipo 1, disciplinas "ómicas" que conducen a las firmas moleculares y al fenotipado estandarizado del asma y del dolor crónico, bioinformática traslacional que convierte datos "ómicos" voluminosos en modelos predictivos, análisis de la dinámica del proteoma y del lipidoma revela la regulación funcional del metabolismo global de los lípidos, efectos de la dieta en la medición multi-ómica y la relación entre las variantes genéticas y la dieta en la modulación del riesgo cardiometabólico.

Tabla 5. Panorama general de algunas aplicaciones de la lipidómica en la investigación biomédica. <sup>28</sup>

El lipidoma de un organismo particular tiene relevancia para la manifestación de la enfermedad ya que refleja los cambios metabólicos que pueden ser consecuencia de la enfermedad. Por lo tanto, estos cambios en las moléculas pueden considerarse marcadores potenciales para la detección temprana de la enfermedad. Los fluidos biológicos como la sangre / suero / plasma, orina, líquido cefalorraquídeo son las fuentes principales de lípidos, además del líquido lagrimal y el humor acuoso, que proporcionan una huella digital molecular fácilmente accesible reflejando el estado de la enfermedad o la terapia. <sup>30</sup>

## 3.2 Glucómica

La glucómica es una disciplina emergente centrada en definir las estructuras y funciones de los glucanos en los sistemas biológicos. El glucoma es el repertorio de glucanos expresados en una célula u organismo. Los glucanos unidos a macromoléculas ejercen el control a través de mecanismos indirectos sobre la conformación, estabilidad, oligomerización, tiempo de residencia en la superficie celular de las glucoproteínas y muchas de las proteínas de unión a glucanos en animales interactúan con los glucanos derivados del microbioma, así como los expresados por los patógenos que infectan a estos animales. Hay pocos estudios sobre las estructuras y funciones de los glucanos debido a que la mayoría de los glucanos en tejidos humanos y animales permanecen indefinidos estructuralmente, la expresión es típicamente específica del tipo de célula y depende del desarrollo y la diferenciación de las células.<sup>31</sup>

Se requieren procesos para el metabolismo adecuado de los glucanos y la interrupción de cualquiera de ellos puede causar una patología celular importante que influye en la formación o degradación de los glucanos. Incluso si no se sospecha de un trastorno congénito de la glucosilación, la glucómica proporciona una herramienta diagnóstica para la detección de la enfermedad y su biología y fisiopatología subyacentes, el perfilado glucómico es útil para priorizar las mutaciones candidatas y para comprender mejor el mecanismo por el cual la glucosilación puede afectar o verse afectado por mutaciones causantes de enfermedades.<sup>32</sup> En un estudio en 2015, se llevó a cabo el perfilado glucómico de transferrina humana plasmática mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de alta definición para el diagnóstico e identificación de subtipos en desórdenes congénitos de la N-glucosilación; presentando un diagnóstico directo de la mayoría de los defectos de procesamiento y biosíntesis de N-glucanos, que permite un monitoreo sensible de las terapias actuales y futuras.<sup>33</sup>

## 4. Aportaciones

### 4.1 Estudio del microbioma

El intestino humano alberga miles de millones de microorganismos que constituyen la microbiota intestinal. Estos microorganismos exhiben relaciones comensales, simbióticas y patógenas con el huésped y entre ellos mismos. A la colección de todo el material genético obtenido de estos microorganismos se le denomina microbioma. El microbioma intestinal humano comprende más de 1000 especies microbianas, que se agregan a aproximadamente 1.5 kilogramos de biomasa. El microbioma incluye bacterias, virus, arqueas y organismos eucarióticos como los hongos.<sup>34</sup>

El intestino es considerado como el centro de toda la actividad que integra los aportes ambientales, como la dieta y el entorno, con señales genéticas e inmunes que afectan la fisiología general del huésped, incluido el metabolismo. El microbioma confiere funciones metabólicas y otras funciones esenciales a la fisiología humana, incluida la digestión de los componentes de los alimentos, la síntesis de vitaminas esenciales, la estimulación y regulación del sistema inmunitario, la competencia de patógenos y eliminación de toxinas y carcinógenos, así como el soporte de la función intestinal. Muchas de estas funciones están interconectadas ya que el microbioma contribuye al metabolismo humano general y los metabolitos microbianos producidos allí, desempeñan funciones esenciales en los procesos inmunomoduladores de todo el organismo humano. En el contexto del sistema inmunitario humano, existe una estrecha conexión por la cual el sistema inmunitario puede afectar al microbioma intestinal y su capacidad metabólica, y viceversa. También interactúa con otros sistemas del cuerpo a través de los sistemas circulatorio, endocrino y nervioso. Los cambios en la ecología microbiana del intestino pueden culminar en disbiosis, un desequilibrio patológico en la microbiota intestinal con disfunciones implícitas en el complejo conjunto de procesos que rigen la salud humana.<sup>35</sup>

Para realizar estudios en microbiota intestinal humana, deberían emplearse idealmente las muestras obtenidas mediante biopsia de mucosa. Sin embargo, debido a los desafíos relacionados con el procedimiento de muestreo correspondiente, se recolectan principalmente las muestras de heces. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se

encontró como una de las principales enfermedades descritas en relación con los estudios de metabolómica y microbiota intestinal. La EII es una enfermedad idiopática que afecta principalmente el tracto gastrointestinal. Dos formas principales, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, tienen una etiología compleja. Por ejemplo, *Faecalibacterium prausnitzii*, que es un productor prominente de ácidos grasos de cadena corta en el intestino humano, disminuye en pacientes con EII, lo que muestra la conexión entre las bacterias y los metabolitos. Cabe señalar que los patrones metabólicos, que con frecuencia se informa que están involucrados en la EII, son probablemente más inespecíficos y son más bien una consecuencia de la inflamación o alteración de la microbiota intestinal que la causa. Un aumento de aminoácidos en muestras fecales de pacientes con EII se explica como un efecto de malnutrición, ya que el tejido intestinal inflamado tiene una baja absorción de nutrientes.<sup>18</sup>

Específicamente la concentración de ácidos grasos de cadena corta y aminoácidos son los que permiten un vínculo entre la abundancia y las propiedades funcionales de las bacterias en el intestino. Por lo tanto, es limitada la traducibilidad a la salud humana y la enfermedad en la investigación con modelos de roedores. Aunque los modelos animales ofrecen herramientas poderosas para investigar los principios de las vías metabólicas y la interacción entre el huésped y la microbiota, es de suma importancia recurrir a los modelos animales que tienen una mayor proximidad con los humanos en términos de fisiología intestinal, inmunología y nutrición. El cerdo ha sido propuesto como un excelente modelo no primate, especialmente en términos de su fisiología intestinal y dieta omnívora. Las influencias sobre el metaboloma fecal son múltiples. La mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo en modelos de roedores con el objetivo de caracterizar y cuantificar la contribución de la edad, la administración de fármacos y la descripción metabólica de diferentes enfermedades. La investigación en seres humanos se limita hasta la fecha a enfermedades como el cáncer, la enfermedad celíaca, el hígado graso no alcohólico, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, así como a la caracterización de los efectos dietéticos sobre el metaboloma fecal. Componentes en la comida, por ejemplo el queso y la leche, y los componentes dietéticos específicos (por ejemplo, fibra de povidex, glucosinulados en la dieta, carcinógenos asociados a los alimentos, fructanos y extracto de jugo de uva) generan su impronta en la composición del metabolito de las heces y pueden usarse para la detección de biomarcadores de alimentos, apoyando así la discusión de los

efectos beneficiosos o adversos en el huésped. Las influencias dietéticas también pueden desempeñar un papel importante cuando se analiza la composición de la microbiota en los seres humanos y primates en lo que respecta al tipo de residencia, el origen geográfico y las diferencias estacionales.<sup>18</sup>

La caracterización detallada de la comunidad microbiana, su función y variabilidad revelarán importantes interacciones entre el huésped y el microorganismo, así como las interacciones microorganismo-microorganismo y sus implicaciones diagnósticas, terapéuticas y preventivas. El proyecto del microbioma humano (HMP) se estableció en 2007 como otro consorcio global. El HMP y el Consorcio Europeo de Metagenómica del Tracto Intestinal Humano apuntan a la secuenciación de todos los microorganismos (eucariotas, arqueas, bacterias, virus) que habitan sitios específicos del cuerpo, como la boca, la garganta y las vías respiratorias, el estómago e intestino, el sistema urogenital y la piel, respectivamente. Mientras que el HMP se ha desarrollado en un campo importante de la investigación biomédica, la microbiota intestinal en particular juega un papel importante en numerosas funciones fisiológicas y la patogénesis de enfermedades gastrointestinales, en la obesidad/síndrome metabólico, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y neurológicas/psiquiátricas, lo que la convierte en uno de los temas actuales más dinámicos en la investigación biomédica.<sup>36</sup>

El propósito general de la metabolómica aplicada al intestino se puede generalizar en dos categorías amplias: a) para estudiar diversas enfermedades o b) para comprender el impacto de los componentes específicos de la dieta. Los microorganismos y sus alteraciones metabólicas resultantes (>600 metabolitos microbianos) se han relacionado con: enfermedades (>35), intervenciones dietéticas, exposición a metales y/o tratamiento con antibióticos. Para asociar los microorganismos y sus funciones, los conjuntos de datos de metagenómica se procesan para identificar las especies microbianas más abundantes dentro de la comunidad intestinal y se catalogan los genes. Estos genes se anotan funcionalmente al alinearlos con el representante de las familias de genes ortólogos. Además, estos conjuntos de genes podrían integrarse a las vías metabólicas. Para comprender en detalle la asociación entre la microbiota intestinal y sus funciones, los estudios metabolómicos pueden diseñarse para ser dirigidos a los metabolitos relacionados

con los microbiomas, como ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos de cadena ramificada, compuestos orgánicos volátiles, ácidos biliares, etc. <sup>34</sup>

Los cambios en el microbioma y el sistema inmunitario durante la infancia pueden tener efectos duraderos, así como contribuir al desarrollo de alergias. Ocurren cambios diversos en la microbiota durante los primeros 2 años de vida y se correlacionan con los cambios en el entorno y la dieta, que pueden rastrearse estudiando los cambios en los metabolomas fecales de los bebés. Un estudio que siguió a los bebés con riesgo de enfermedad celíaca muestra que los metabolitos de los bebés de menos de 6 meses de edad eran mayoritariamente azúcares, incluida la lactosa y la glucosa. Sin embargo, después de 6 meses, sus metabolomas cambiaron, aumentando las concentraciones de aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta. El análisis de componentes principales mostró que el metaboloma de los bebés a los 2 años de edad se parece más al de los adultos, debido al aumento en los niveles de acetato y butirato. Estos hallazgos muestran que la microbiota infantil se parece a la de los adultos de la misma comunidad a los 2 años de edad. También indica que la microbiota intestinal de los bebés está específicamente adaptada para metabolizar la fuente de nutrimentos más temprana del bebé, la leche materna. Las especies de *Bifidobacterium* regulan el procesamiento de oligosacáridos derivados de la leche humana. Éstos pueden tener una ventaja competitiva que los coloca entre los primeros colonizadores del intestino humano. <sup>37</sup>

Varios investigadores han utilizado diferentes enfoques metabolómicos para estudiar en diferentes modelos animales las interacciones entre la microbiota intestinal y el huésped (Martin et al., 2008; Swann et al., 2011; Lee et al., 2015; Kim et al., 2015). En el estudio de Wikoff et al, (2009) aplicaron una amplia técnica metabolómica basada en la espectrometría de masas para estudiar el efecto de los microorganismos intestinales en la bioquímica de la sangre. Cuando las muestras de plasma de ratones estériles se compararon con muestras de animales convencionales utilizando varios métodos basados en EM, las concentraciones plasmáticas de triptófano fueron 40% más altas, mientras que el N-acetilriptófano fue 60% más alto que los niveles registrados en sus respectivas contrapartes convencionales. También varios metabolitos microbianos en la fase II se elevaron significativamente en el plasma de los animales convencionales, lo que indica la participación de la microbiota intestinal en el metabolismo del huésped. En el estudio metabolómico no dirigido de Zheng

et al. (2011) basado en EM-CG y EM-CL para perfilar los metabolitos urinarios y fecales de ratas Wistar después de la preexposición y recuperación de antibióticos, observaron una alteración significativa en los perfiles metabólicos, así como una interrupción del metabolismo energético después del tratamiento con antibióticos. Se encontraron grandes cantidades de triptófano y triptamina tanto en heces como en muestras de orina, mientras que en las muestras de orina se encontraron grandes cantidades de sulfato de 6-hidroxi-melatonina, lo que indica una depleción de las bacterias que metabolizan estas moléculas. Para determinar cómo el consumo crónico de etanol altera los ácidos biliares en el hígado, el tracto gastrointestinal y el suero, en un estudio realizado por Xie et al. (2013) se alimentaron a las ratas con una dieta líquida Lieber-DeCarli con 38% de calorías en forma de etanol. Se encontraron grandes cantidades de ácidos biliares conjugados en el hígado, el duodeno y el íleon, mientras que los ácidos biliares no conjugados fueron la mayor proporción de ácidos biliares medidos en suero, el ciego y el recto. La administración de etanol causó una disminución de los ácidos biliares conjugados con taurina en el hígado y el tracto gastrointestinal, mientras que las especies no conjugadas y conjugadas con glicina aumentaron. Los autores propusieron que los cambios inducidos por el etanol en la microbiota intestinal podrían haber causado las alteraciones en los perfiles de ácidos biliares. Walker et al. (2014) también estudió la naturaleza y la especificidad de los perfiles metabólicos relacionados con la microbiota intestinal y la obesidad utilizando metabolómica y análisis de microbiomas intestinales. Las cepas de ratones obesos C57BL/6J(C57J) y las cepas magras C57BL/6N(C57N) se alimentaron con una dieta alta en grasas durante tres semanas, pero solo los ratones C57J se volvieron obesos. El perfil metabólico mostró altos niveles de ácido desoxicólico, sulfato de ácido taurocólico, ácido araquidónico y ácido taurocólico en el grupo obeso, mientras que el ácido eicosadienoico, I-urobilinógeno y urocortisol estaban presentes en el grupo magro. Mediante este estudio, los investigadores accedieron a algunos aspectos funcionales de las interacciones y el metabolismo del microbioma intestinal y el huésped, así como a nuevos factores que podrían contribuir a la obesidad inducida por la dieta alta en grasas.<sup>38</sup>

En otro estudio para determinar si el consumo crónico de café podría mitigar la microbiota intestinal negativa y los cambios en el perfil metabólico inducidos por una dieta alta en grasas, observaron una reducción en la proporción de *Firmicutes-Bacteroidetes* generalmente asociada con una alimentación alta en grasa.<sup>39</sup>

## 4.2 Aportaciones a las ciencias forenses

La determinación del momento de la muerte todavía representa un desafío para la comunidad científica. Durante una investigación forense, la estimación del intervalo postmortem normalmente se basa en factores tales como la temperatura central del cuerpo, *livor mortis*, *rigor mortis* u otra evidencia externa al propio cuerpo, como el momento en que ocurrió la última actividad telefónica registrada. Con el fin de evaluar con precisión el momento de la muerte, se han establecido varios métodos químicos desde principios de la década de 1970 con muestras de hígado, músculo esquelético, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo y suero.<sup>40</sup> Es por ello que los estudios de metabolómica pueden aportar valiosa información para una mejor comprensión de los cambios moleculares que ocurren después de la muerte, así mismo permitiría aportar información que puede aplicarse a los trasplantes, la investigación del cáncer y las ciencias forenses. Uno de los estudios más destacados en esta área, combinó el perfilado metabólico basado en RMN con estadística multivariada para evaluar las modulaciones metabólicas secuenciales después de la muerte. El corazón fue uno de los tejidos que más modulaciones metabólicas experimentó después de la muerte. En total, se produjeron 65 modulaciones metabólicas al comparar los tres puntos de tiempo diferentes. Estas modulaciones se distribuyeron uniformemente entre las tres posibles comparaciones por pares. En la comparación entre el punto temporal 1 (inmediatamente después de la muerte) contra el punto temporal 2 (seis horas después), la inosina y el ATP fueron los dos metabolitos que disminuyeron drásticamente en el PT2 en comparación con PT1; por el contrario, el glicerol y el malonato fueron mayores en PT2 que en PT1. En el punto temporal 3 (24 horas después de la muerte) comparado con PT1 tenía niveles significativamente más altos de fenilalanina y algunos aminoácidos de cadena ramificada. A la inversa, PT3 tenía niveles más bajos de niacinamida, inosina y de transportadores de energía como IMP y ATP. Finalmente, la comparación entre PT2 y PT3 mostró que las principales diferencias que impulsan el modelo provienen del aumento de adenina y niacinamida en PT3.<sup>40</sup>

El riñón fue otro tejido que mostró numerosas alteraciones metabólicas después de la muerte, reflejadas por un total de 70 fluctuaciones metabólicas. Las diferencias metabólicas que se producen en el riñón después de la muerte incluyen principalmente niveles más bajos de inosina y niveles más altos de lactato en PT2 en comparación con PT1. En el modelo

que comparó PT1 y PT3, las diferencias se debieron a niveles significativamente más bajos de inosina, uracilo y taurina. En contraste, PT3 tenía niveles más altos de fenilalanina y tirosina. En consecuencia, las diferencias metabólicas observadas en el tejido renal entre PT2 y PT3 incluyeron niveles más bajos de inosina, niacinamida y adenina y niveles significativamente más altos de fenilalanina y tirosina en PT3. <sup>40</sup>

El hígado, a diferencia de los órganos anteriores, mostró solo 34 diferencias metabólicas en total, lo que indica que este órgano tiene cierta resistencia a la degradación metabólica después de la muerte. Las diferencias entre PT1 y PT2 se caracterizaron principalmente por una disminución de maltosa y glutamato en PT2 en comparación con PT1, y un aumento de acetato que es un signo de degradación para la acetil-CoA que ya no puede ingresar al ciclo de Krebs en la mitocondria debido a la falta de oxígeno. PT3 mostró niveles significativamente más altos de creatina en comparación con PT1, mientras que los niveles de glutatión se redujeron drásticamente. Finalmente, el PT3 también mostró niveles más altos de maltosa y creatina, y tenía niveles de glucosa ligeramente más bajos que el PT2. <sup>40</sup>

El órgano que mostró el mayor número de fluctuaciones metabólicas fue el bazo, con 75 modulaciones en total entre diferentes puntos temporales. Durante las 6 horas de tiempo transcurrido entre PT1 y PT2, el lactato y el acetato aumentaron. Por el contrario, la glucosa, la creatina y la taurina disminuyeron significativamente seis horas después de la muerte. Al comparar PT1 y PT3, taurina, colina, inosina y adenina fueron significativamente más bajas en PT3, mientras que la fenilalanina y la tirosina aumentaron. Finalmente, las diferencias metabólicas entre PT2 y PT3 estaban representadas por niveles más bajos de taurina, colina y glutamato en PT3, y niveles más altos de creatina y fenilalanina. <sup>40</sup>

Las muestras de piel mostraron pequeñas diferencias a lo largo del tiempo, contando solo 28 modulaciones metabólicas detectables en total. Estas diferencias incluían, por ejemplo, niveles más altos de lactato después de 6 h desde el momento de la muerte (PT2), lo que podría estar asociado con la actividad bacteriana y niveles más bajos de glucosa y taurina. Las diferencias entre PT1 y PT3 fueron similares a las variaciones metabólicas observadas entre PT1 y PT2, además de niveles elevados de creatina, fenilalanina, tirosina e histamina en PT3. La comparación metabólica entre PT2 y PT3 mostró niveles más bajos de lactato, fumarato y maltosa y niveles más altos de fenilalanina, tirosina e histamina en PT3. <sup>40</sup>

En otro estudio, se revisaron los biomarcadores toxicológicos relacionados con el metabolismo y la metabolómica de los opiáceos, con especial interés en su relevancia como posibles biomarcadores clínicos y forenses antemortem y postmortem. Se sabe que la heroína es principalmente un profármaco que se desacetila rápidamente en sangre a su metabolito activo, la 6-acetilmorfina, que posteriormente se desacetila lentamente a morfina. Por lo tanto, la 6-acetilmorfina se ha utilizado como el principal metabolito diana en la rutina forense. Sin embargo, su aplicabilidad es limitada debido a la ventana de detección reducida. Por lo tanto, la morfina (y sus metabolitos morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido), codeína, codeína-6-glucurónido, 6-acetilcolina, noscapina (y sus metabolitos meconina, desmetilmeconina y cotarnina), papaverina (y sus metabolitos 6-desmetilpapaverina, hidroxipapaverina, dihidroxipapaverina, 6-desmetilpapaverinaglucurónido) y tebaína (y acetiltebaol y el análogo no acetilado tebaol) se han aplicado y recomendado para obtener los resultados forenses más fiables. Cabe destacar que los perfiles urinarios y/o sanguíneos, no documentan las alteraciones reales en los órganos diana pertenecientes al sistema nervioso central o las regiones periféricas; esto es en comparación con otros órganos, porque el cerebro conlleva una mayor complejidad metabólica y geográfica, lo que hace que el análisis metabolómico de sus diferentes áreas sea muy difícil y laborioso. Además, el cerebro es un compartimiento relativamente aislado debido a la presencia de una barrera hematoencefálica que limita el flujo de fármacos y de metabolitos endógenos entre el cerebro y el resto del cuerpo. Una de las posibles soluciones a este problema puede ser aplicar metabolómica en ciertas áreas del cerebro o en el líquido cefalorraquídeo en estudios futuros. Finalmente, se requerirán estudios longitudinales para aprobar y ampliar estos hallazgos iniciales. <sup>41</sup>

#### 4.3 Estudio del cáncer

El cáncer se caracteriza por la proliferación descontrolada de células y su eventual transformación en malignidad. Puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo; principalmente en la próstata, los pulmones, el colon, las glándulas mamarias, el cerebro, el cuello uterino, el riñón, la sangre, el hígado, el páncreas, el ovario, el útero, la piel, la boca, la tiroides y los testículos. Generalmente se desencadena por: xenobióticos (aminas heterocíclicas), aberraciones genéticas (inestabilidad de microsatélites, alteraciones del

número de copias somáticas), radiaciones, virus (virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr, virus del papiloma humano), etc.; sin embargo, muchas causas desconocidas aún están por identificarse. Los mecanismos predominantes para el cáncer son el deterioro de las vías de reparación del ADN, la conversión de genes normales en oncogenes y el mal funcionamiento del gen supresor de tumores. Existen varios diagnósticos clínicos considerados como estándar de oro y las pruebas de vigilancia para la detección del cáncer; biopsia, química sanguínea, biometría hemática, pruebas basadas en imágenes (la tomografía computarizada y la imagen por resonancia magnética), radiografía de tórax, prueba de función hepática, prueba de médula ósea, mamografía, colonoscopia y cistoscopia. Aun así, en algunos casos el cáncer no se detecta (baja sensibilidad en tumores benignos en etapa I) y finalmente, cuando se identifica (etapa maligna), suele ser demasiado tarde para tratar. Además, los procedimientos invasivos combinados con un alto costo hacen que sea un diagnóstico desafiante.<sup>42</sup>

Dentro de las aportaciones que la metabolómica puede ofrecer a este campo de la biomedicina, se sugiere que el cáncer en etapa temprana puede ser detectable mediante la búsqueda de cambios metabólicos simples como el aumento en los niveles de acetato, lactato, serina, sarcosina, asparagina, dimetilespermidina, betaína o colina en sangre, saliva, aliento u orina. La detección de metabolitos empleando técnicas de metabolómica podría proporcionar una manera rápida y costo-efectiva de identificar los cánceres en etapa temprana o las lesiones pre-cancerosas. Es de vital importancia la detección temprana del cáncer, porque hasta la fecha sigue siendo la mejor ruta para garantizar resultados óptimos de tratamiento.<sup>43</sup> Otra área de oportunidad radica en la capacidad de llevar a cabo el fenotipado metabólico de los cánceres, mediante análisis metabolómicos en sangre, imágenes mediante tomografía por emisión de positrones o espectroscopia de resonancia magnética. Algunos tipos de cáncer parecen preferir la glucólisis aeróbica, otros dependen más de la glutaminólisis, mientras que otros utilizan una combinación de dos o más de estas vías. El uso de métodos no invasivos para identificar a cuál de los distintos "tipos metabólicos" a los que podría pertenecer un tumor, permitiría un ajuste personalizado y mejor informado sobre las terapias contra el cáncer. Wishart D.S. (2015) concluye que si bien el cáncer como enfermedad genética parece ser bastante complejo, el cáncer como enfermedad metabólica parece ser notablemente simple.<sup>44</sup> En otro estudio se realizó el análisis detallado de la función de la mayoría de los oncogenes y supresores de tumores, y

sugirió que muchos desempeñan un papel clave en el metabolismo celular.<sup>45</sup> De hecho, parece que muchas de las mutaciones de cantidad aparentemente infinita en cáncer y genes de cáncer en humanos parecen afectar a tres vías metabólicas principales: a) glucólisis aeróbica, b) glutaminólisis y c) metabolismo de un carbono. Estas vías permiten que las células cancerígenas pasen de la simple producción de energía en forma de ATP a generar grandes cantidades de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros intermediarios necesarios para un rápido crecimiento y división celular.<sup>44</sup> Las células cancerosas exhiben un fenotipo metabólico distinto, que consume hasta 200 veces más glucosa que las células normales. Este fenotipo glucolítico, conocido comúnmente como el efecto Warburg, se ha encontrado en casi todos los tipos de cáncer. Los oncometabolitos son metabolitos endógenos que dan inicio o sostienen el crecimiento tumoral y la metástasis. El primer oncometabolito que se identificó fue el 2-hidroxiglutarato, posteriormente se han identificado (Ver tabla 6) muchos otros oncometabolitos como; fumarato (carcinoma de células renales), succinato (paraganglioma), sarcosina (cáncer de próstata), asparagina (leucemia), colina (cáncer de mama, cerebro y próstata) y poliaminas (la mayoría de tipos de cáncer). Casi todos estos oncometabolitos surgen de, o son necesarios para, una serie de vías metabólicas clave asociadas con el cáncer, incluida la glucólisis aeróbica, la glutaminólisis y el metabolismo de un carbono. Algunos ejemplos de biomarcadores de metabolitos asociados al cáncer son: fosfocolina, isoleucina, treonina, glutamato, histidina, acetoacetato, glicerol, manosa, fenilalanina y piruvato en el cáncer de mama; taurina, lactato, colina, fenilalanina, isoglutamina, tirosina, lípidos, triglicéridos, intermediarios del ciclo de Krebs en el cáncer colorrectal; fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfocolina, glicerofosfocolina y ácido araquidónico en cáncer de cabeza y de cuello. La HMDB es actualmente la base de datos más grande y completa de metabolómica específica del organismo. Contiene cerca de 42,000 entradas de metabolitos, más de 5000 concentraciones de metabolitos normales y anormales, cerca de 800 vías metabólicas y asociadas a enfermedades, e información detallada sobre docenas de biomarcadores de cáncer.<sup>46</sup>

Todos los metabolitos enlistados a continuación son necesarios para la supervivencia del tumor o la propagación del tumor, sus concentraciones se elevan localmente en los tumores pero no en los tejidos circundantes. La mayoría de ellos altera vías importantes de señalización celular y división celular.<sup>47</sup>

Oncometabolito	Mecanismo en el cáncer
2-hidroxiglutarato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la señalización de proteínas mTOR y de ATP sintasa</li> <li>• Inhibe las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que activan las vías oncogénicas del factor inducido por hipoxia y alteran los patrones de metilación del ADN</li> <li>• Producido por mutaciones de ganancia de función en el gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa</li> <li>• Elevado en gliomas y leucemia mieloide aguda</li> </ul>
Fumarato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que activan las vías oncogénicas del factor inducido por hipoxia y alteran los patrones de metilación del ADN</li> <li>• Conlleva a la formación de succinato de proteínas y al metabolismo alterado</li> <li>• Producido por mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la fumarasa</li> <li>• Elevado en carcinoma de células renales</li> </ul>
Succinato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que activan las vías oncogénicas del factor inducido por hipoxia y alteran los patrones de metilación del ADN</li> <li>• Producido por mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la succinato deshidrogenasa</li> <li>• Elevado en paraganglioma y tumores renales y tiroideos</li> </ul>
Sarcosina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activa la vía de señalización de proteínas mTOR</li> <li>• Elevado por la enzima mutada glicina-N-metiltransferasa</li> <li>• Elevado en cáncer de próstata metastásico</li> </ul>
Glucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente esencial de carbono para favorecer el anabolismo de las células cancerosas, la anaplerosis del ciclo de Krebs y la glucólisis aeróbica</li> <li>• Activa la hexocinasa II</li> <li>• Activa las proteínas reguladas por la glucosa que alteran la señalización, proliferación, invasión y apoptosis</li> <li>• Elevado en la mayoría de los cánceres</li> </ul>
Glutamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente esencial de nitrógeno para favorecer el anabolismo de las células cancerosas y la glucólisis aeróbica</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente esencial de carbono para la anaplerosis del ciclo de Krebs</li> <li>• Elevado en los tipos de cáncer dependientes del gen MYC</li> </ul>
Asparagina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente esencial de nitrógeno para favorecer el anabolismo de las células cancerosas y la glucólisis aeróbica</li> <li>• Agente anti-apoptótico</li> <li>• Elevado en leucemia linfoblástica aguda</li> </ul>
Colina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actúa como donante de metilo para la metilación del ADN lo cual interrumpe la reparación del ADN y la expresión génica</li> <li>• Modifica la señalización de lípidos</li> <li>• Fuente esencial de carbono y nitrógeno para favorecer la síntesis de fosfolípidos en células que se dividen rápidamente</li> <li>• Elevado en cáncer de mama, cerebro y próstata</li> </ul>
Lactato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye el pH extracelular e induce metástasis</li> <li>• Induce inmunosupresión local</li> <li>• Elevado en la mayoría de tipos de cáncer</li> </ul>

Tabla 6. Oncometabolitos y sus mecanismos en el cáncer. <sup>47</sup>

En cuanto a técnicas de detección de cáncer de pulmón, los métodos convencionales no son óptimos por ser invasivos y costosos, tales como la broncoscopia y tomografía computarizada. <sup>48</sup>

En la figura 4 se muestra el microbioma tridimensional y cartografía metabólica de un pulmón humano con fibrosis quística. <sup>49</sup> En un estudio prospectivo utilizando muestras de aliento y aliento condensado, se encontraron compuestos orgánicos volátiles (n-dodecano, 2-butanol, 2-metilfurano y n-nonanal) que pueden usarse como biomarcadores del cáncer pulmonar; empleando la espectrometría de movilidad de iones con columna multicapilar, un dispositivo de análisis de la exhalación, es capaz de detectar en menos de 8 minutos (tiempo total de análisis) y su ventaja frente a la EM-CG es que se puede aplicar en la cama del paciente y la toma de la muestra requiere ninguna preparación. <sup>48</sup>

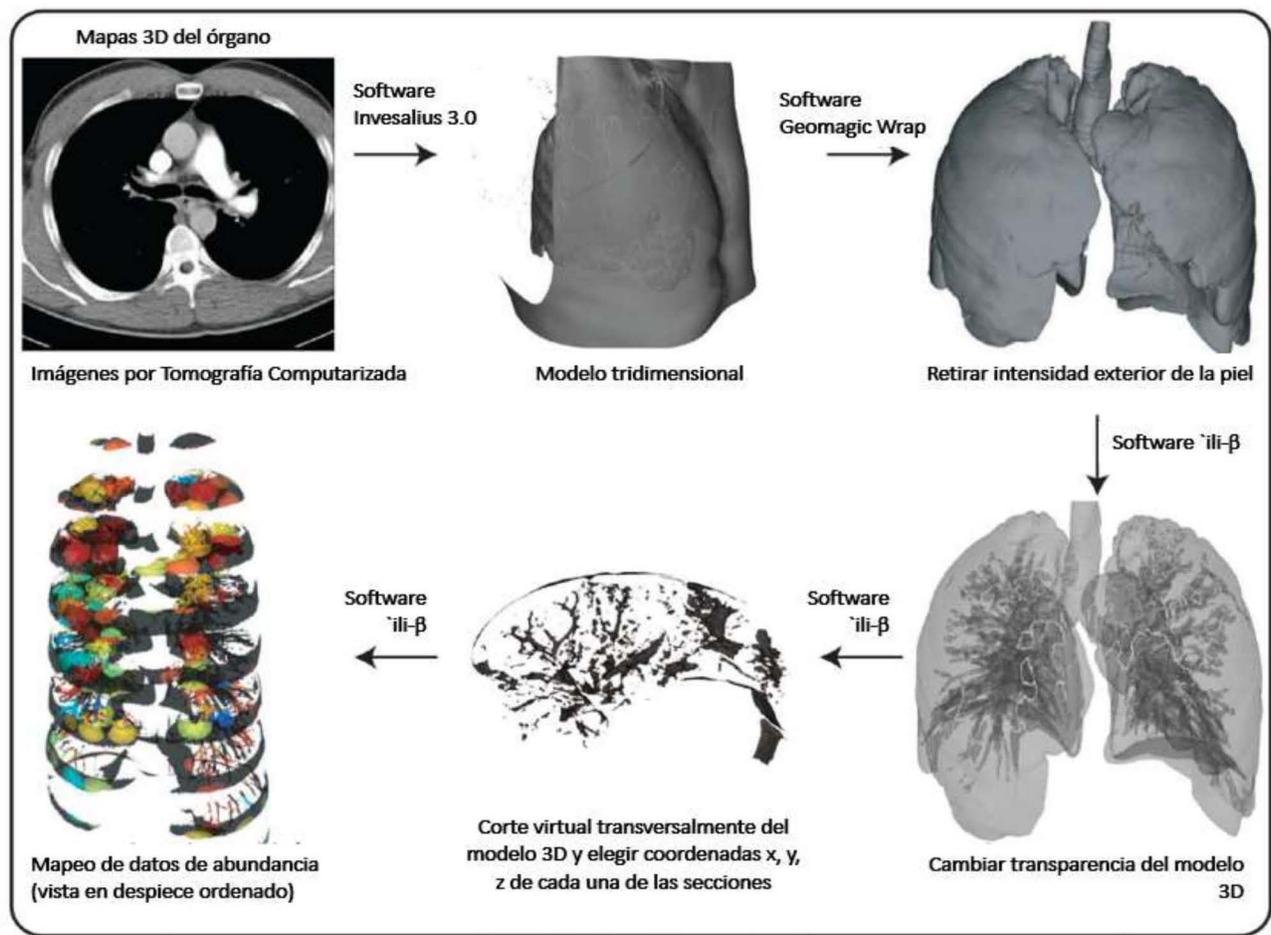


Figura 4. Tecnología que permite la cartografía 3D de las moléculas y los microorganismos en una imagen radiológica, como los rayos X o la tomografía computarizada de un órgano humano. Demuestra el concepto de metaboloma al revelar la química asociada con el microbioma del pulmón de un paciente con fibrosis quística. <sup>49</sup>

El cáncer de tiroides es el tumor endocrino más común en las últimas décadas y su incidencia está en aumento en todo el mundo. El cáncer de tiroides parte de la formación de nódulos tiroideos detectables por ecografía; los nódulos tiroideos son en su mayoría benignos y la herramienta discriminatoria estándar de oro actual entre cáncer de tiroides y nódulos tiroideos benignos es el análisis citopatológico de muestras de aspiración percutánea con aguja fina. La aspiración con aguja fina es una prueba simple que toma muestras de una pequeña cantidad de tejido de la tiroides con una aguja muy delgada. El informe histopatológico de la aspiración con aguja fina presenta puntos débiles, que son los resultados indeterminados, el valor predictivo negativo y un costo elevado. Por lo tanto,

existe la gran necesidad de encontrar marcadores para respaldar o para reemplazar la aspiración con aguja fina. Hay estudios que sugieren el beneficio del enfoque de oncometabolitos como la aplicación potencial para la herramienta de diagnóstico cooperativo, el análisis metabólico de muestras de la aspiración con aguja fina de nódulos tiroideos. Las vías metabólicas vinculadas con el cáncer de tiroides son el ciclo de Krebs, la vía de las pentosas fosfato y el metabolismo de los lípidos, que servirán como biomarcadores candidatos para discriminar entre las células cancerosas y las normales.<sup>50</sup> Los biomarcadores potenciales comunes a todas las lesiones tiroideas fueron principalmente ácidos grasos, aminoácidos, fosfolípidos de membrana celular, metabolitos de estrógenos, metabolitos de purina y pirimidina, citrato, lactato, glucosa, manosa, piruvato, la glicosilación del 3-hidroxiacetato, colina, derivados de colina y mio-/escilo-inositol. Entre todos los metabolitos, el citrato resultó el primer oncometabolito más significativo y el lactato como segundo en neoplasias malignas tiroideas.<sup>50</sup> En el estudio de Gu et al. (2015) se mostraron los perfiles de aminoácidos libres en plasma de pacientes con cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer gástrico, para evaluar su potencial diagnóstico; carnitina, N-óxido de trimetilamina, prolina, glutamina y asparagina fueron los metabolitos más significativos de 392 metabolitos en el cáncer tiroideo, en muestras de suero de los pacientes, la cantidad de metabolitos como valina, leucina, isoleucina, ácido láctico, alanina, ácido glutámico, lisina, glicina, mientras que los lípidos, la colina y tirosina disminuyeron.<sup>51</sup>

El cáncer de páncreas sigue siendo uno de los cánceres con peor pronóstico y su tasa de supervivencia a cinco años es inferior al 5%. La alta tasa de mortalidad del cáncer de páncreas es por la falta de síntomas específicos tempranos. La detección temprana es sumamente importante para mejorar la tasa de supervivencia y el pronóstico del cáncer de páncreas. Se han utilizado para el diagnóstico complementario los marcadores tumorales que incluyen enzimas pancreáticas en suero y antígenos de carbohidratos, como el antígeno carbohidrato 19-9, antígeno carcinoembrionario, antígeno s-pancreas-1 y antígeno monoclonal pancreático Duke tipo 2. Sin embargo, a pesar del incremento de estos marcadores del cáncer de páncreas en etapa avanzada, su sensibilidad es limitada y en muchos casos se han encontrado falsos negativos. Estos marcadores tumorales no son útiles para el diagnóstico temprano, en el momento en que es posible la cirugía. Por lo tanto, es importante establecer una tecnología simple y económica con poca invasividad para la detección eficiente del cáncer de páncreas en etapa temprana.<sup>52</sup>

El cáncer de páncreas es inducido por anomalías de varios genes supresores de tumores, lo cual acelera la síntesis de poliaminas y como consecuencia afectan varias vías principales. La síntesis de poliaminas se basa en el suministro de ornitina, que se obtiene a partir de arginina mediante la arginasa; luego la ornitina se convierte en putrescina por la ornitina descarboxilasa (ODC), seguida de la formación de espermidina por la enzima espermidina sintasa y la S-adenosilmetionina, proveniente de las vías de metionina. La ODC está regulada negativamente por la interacción con la antienzima 1 de la ornitina descarboxilasa, que a su vez, regula tanto la biosíntesis de las poliaminas como el transporte para mantener la homeostasis.<sup>52</sup>

El cambio drástico en estas vías metabólicas inducido por la mutación de los oncogenes se ha reportado en otros tipos de cáncer; la actividad aumentada de las vías de poliaminas en el cáncer colorrectal, por ejemplo, la enzima ODC está regulada negativamente por el gen supresor de tumores de la poliposis adenomatosa en el tejido de la mucosa colónica. La pérdida de la función debida a la poliposis adenomatosa activaría la enzima ODC, lo que resultaría en la activación de la biosíntesis de poliaminas. La pérdida de la función del gen p53 y del gen SMAD4, frecuentemente observada en el cáncer de páncreas, incrementa el metabolismo de las poliaminas. La regulación positiva del gen MYC, que lleva a un flujo descendente del gen KRAS, también aumenta la biosíntesis y la importación de poliaminas, lo que produce altas concentraciones de poliaminas en las células cancerosas. Estos metabolitos se secretan del tejido tumoral y se propagan a los tejidos circundantes y los vasos sanguíneos. Es por esto que la combinación de poliaminas y metabolitos se ha empleado para el desarrollo de pruebas de detección no invasivas o poco invasivas, como las pruebas de sangre, orina y heces, para identificar pacientes con cáncer colorrectal o pólipos (un precursor de cáncer colorrectal). El catabolismo de poliaminas generalmente implica la N-acetilación del extremo aminopropilo de la espermidina mediante la espermidina acetiltransferasa para formar N1-acetilspermidina y N1,N12-diacetilspermidina. La acetilación de estos metabolitos también se activa en células cancerosas. En particular, se sabe que la N1,N12-diacetilspermidina es secretada por tumores y su concentración se encuentra elevada en la orina de pacientes con cáncer de distintos tipos. En el estudio metabolómico de Asai et al, (2018) basado en EM-EC para análisis exhaustivos de metabolitos hidrofílicos, incluidas las poliaminas, en muestras de saliva de pacientes con

cáncer pancreático se cuantificaron metabolitos, de los cuales tres poliaminas, incluyendo espermidina, N1-acetilespermidina y 2-aminobutanoato. La acetilación de poliaminas para producir N1-acetilespermidina a partir de espermidina se lleva a cabo por la activación de la enzima espermidina N1-acetiltransferasa en tejidos tumorales.<sup>52</sup>

#### 4.4 Estudio de enfermedades neurodegenerativas

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa heterogénea, progresiva y mortal, caracterizada por la pérdida de las neuronas motoras superiores e inferiores y de las vías cerebrales frontotemporales asociadas. A lo largo de la última década, se descubrieron varios biomarcadores neuroquímicos candidatos a partir de análisis de suero y líquido cefalorraquídeo. No obstante, sigue existiendo la necesidad de encontrar biomarcadores que sean sensibles al diagnóstico cuando las características clínicas son atípicas, que permitan estratificar el pronóstico y medir la respuesta terapéutica en la ELA, así como de profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad.<sup>53</sup> En el estudio de Bjornevik et al, (2019) llevaron a cabo un análisis estratificado por tiempo desde la toma de muestra de sangre hasta el comienzo de ELA; a un total de 144 pacientes con ELA se les extrajo sangre dentro de los 5 años del inicio de la enfermedad, mientras que a otros 131 casos se les extrajo sangre 5 años o más, antes del inicio de la enfermedad. El número de metabolitos con concentraciones significativamente diferentes entre los casos y los controles fue mayor en los análisis donde la muestra de sangre se extrajo más cerca del comienzo de ELA, que en aquellos cuyas muestras de sangre fueron recolectadas varios años antes del inicio de la enfermedad. Específicamente, en muestras de plasma recolectadas en un tiempo menor a 5 años antes del comienzo de ELA, 63 metabolitos se asociaron significativamente con un menor riesgo de ELA y 4 con un mayor riesgo de ELA. Los 63 metabolitos con asociaciones inversas, incluían principalmente lípidos (diacilgliceroles y triacilgliceroles, acilcarnitinas, fosfatidilcolinas y otros lípidos), mientras que se encontraron asociaciones positivas para un éster de colesterilo, un fosfoesfingolípido y 2 lisofosfolípidos.<sup>54</sup>

La enfermedad de Alzheimer es la causa principal de demencia que produce pérdida de memoria, dificultad para pensar y cambios de comportamiento; debido a las mutaciones en los genes que codifican la proteína precursora amiloide, esto resulta en un aumento de la

producción de péptidos amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ). Además, hay varios mecanismos independientes de  $A\beta$  que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, como la homeostasis del calcio y los lípidos, la disfunción mitocondrial, la señalización celular alterada, la transmisión sináptica, el estrés oxidante y la inflamación. El declive celular en pacientes con enfermedad de Alzheimer comienza hasta 20 años antes de la manifestación de los síntomas clínicos. A medida que avanza la enfermedad, las múltiples vías se ven afectadas de forma sinérgica activando un círculo vicioso que, en última instancia, destruye la formación neuronal de las sinapsis, lo que provoca una disminución de la función cognitiva. El deterioro metabólico es uno de los primeros síntomas detectados con la tomografía por emisión de positrones con fluorodeoxiglucosa (FDG-PET) en pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), una etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que el metabolismo podría desempeñar un papel esencial en los primeros mecanismos de la enfermedad de Alzheimer. Dependiendo de la etapa de la enfermedad y los rasgos individuales (por ejemplo, edad, género, raza, etc.) las opciones de tratamiento pueden variar y lo más probable es que requieran terapia en combinación. Por lo tanto, las nuevas tecnologías para la detección imparcial de cambios asociados con los mecanismos tempranos de la enfermedad podrían emplearse en el desarrollo de biomarcadores para el diagnóstico preclínico y clínico, el pronóstico y el seguimiento del resultado del tratamiento.<sup>55</sup>

La saliva es un fluido biológico de fácil acceso que contiene proteínas, ácidos nucleicos, enzimas para la descomposición de los lípidos y almidones, y moléculas importantes para las funciones biológicas, como el sabor, la lubricación y las respuestas inmunitarias. A diferencia del líquido cefalorraquídeo y el plasma, la composición de la saliva cambia rápidamente en respuesta a los estímulos biológicos. En el estudio de Yilmaz et al, (2017) se usó metabolómica basada en RMN para identificar 22 metabolitos salivales que eran útiles para distinguir entre pacientes con enfermedad de Alzheimer, con MCI e individuos sanos, identificando cambios significativos en los metabolitos propionato y acetona; galactosa, imidazol y acetona, mientras que la creatina y el 5-aminopentanoato diferenciaron Alzheimer de MCI.<sup>56</sup> En otro estudio basado en EM acoplada a cromatografía de líquidos de ultra alta resolución se analizaron las muestras de saliva de 256 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 218 controles sanos de la misma edad, identificándose mediante análisis de componentes principales seis metabolitos (esfingalina-1-fosfato, ornitina, ácido feniláctico, inosina, 3-deshidrocarnitina e hipoxantina) cuya diferencia fue

estadísticamente significativa entre los grupos de casos y controles. Tres de estos metabolitos (esfinganina-1-fosfato, ornitina y ácido feniláctico) fueron fuertes predictores de la enfermedad de Alzheimer (precisión predictiva; área bajo la curva = 0.998). La ornitina es un metabolito intermediario del metabolismo de las poliaminas, que se vio alterado en el plasma de los pacientes con Alzheimer. Estos resultados demostraron el uso potencial de la metabolómica para desarrollar biomarcadores salivales en el diagnóstico oportuno de la enfermedad de Alzheimer. <sup>57</sup>

La enfermedad de Parkinson afecta al 1% de la población mayor de 60 años y se caracteriza por un temblor en reposo, lentitud del movimiento (bradiquinesia), rigidez de las extremidades, inestabilidad postural y congelación de la marcha. La patogénesis de la enfermedad de Parkinson se asocia con la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas y la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos eosinofílicos (cuerpos de Lewy) en ciertas partes del tallo cerebral, particularmente la masa de células en media luna, conocida como sustancia negra. Los detalles del mecanismo de la degeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson aún no se han elucidado. Chang et al, (2018) realizaron un estudio de metabolómica dirigida utilizando una combinación de análisis de espectrometría de masas de tiempo de vuelo y cromatografía de líquidos, y el kit AbsoluteIDQ® p180, para cuantificar los niveles plasmáticos de 184 metabolitos en una cohorte de descubrimiento que incluía 82 pacientes con Parkinson y 82 controles sanos; encontraron dos metabolitos en plasma regulados positivamente (dopamina y la proporción putrescina/ornitina) y cuatro regulados negativamente (octadecadienilcarnitina C18:2, dimetilarginina asimétrica, triptófano y quinurenina). Después midieron los niveles plasmáticos de un panel de productos metabólicos de la vía de quinurenina en una cohorte de validación independiente que incluyó 118 pacientes con Parkinson, 22 pacientes con enfermedad de Huntington y 37 controles. Se observó una menor proporción de ácido quinurénico/ quinurenina, un mayor nivel de ácido quinolínico y una mayor proporción de ácido quinolínico/ ácido quinurénico en los pacientes con Parkinson, en comparación con los otros grupos de pacientes con Huntington y los controles sanos. Los pacientes con Parkinson en etapa avanzada mostraron una menor proporción de ácido quinurénico/ quinurenina, así como una mayor proporción de ácido quinolínico/ ácido quinurénico en comparación con los pacientes en etapa temprana y los controles. <sup>58</sup>

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo genético en el que el defecto etiológico es una mutación en el gen de Huntington, que altera la estructura de la proteína huntingtina a través del alargamiento de su segmento de poliglutamina, iniciando así una cascada que en última instancia conduce a la muerte prematura. Sin embargo, la neurodegeneración se manifiesta típicamente en la enfermedad de Huntington solo en la mediana edad y los mecanismos que vinculan a la mutación con la enfermedad cerebral son poco conocidos. El metabolismo cerebral se ve gravemente alterado en la enfermedad de Huntington y la proteína huntingtina mutante tiene un papel potencial como impulsor de estas aberraciones metabólicas. En el estudio de Patassini et al, (2016) el objetivo fue determinar los efectos de la enfermedad de Huntington en el metabolismo cerebral mediante la medición de los niveles de metabolitos polares en regiones que se sabe que sufren diversos grados de daño. Realizaron análisis metabolómicos basados en EM-CG en un ensayo de casos y controles de once regiones del cerebro, en tejido humano con retraso corto *post mortem* de nueve pacientes con enfermedad de Huntington bien caracterizados [10.6 horas en promedio (8.1 h - 13.1 h)] y nueve controles emparejados [11.2 horas en promedio (9 h - 13.4 h)]. En cada paciente, se midió el contenido de metabolitos en muestras de tejido representativas de once regiones del cerebro que presentan distintos grados de daño en la enfermedad, identificando así la presencia y la abundancia de 63 metabolitos diferentes de varias clases moleculares, incluidos los hidratos de carbono, aminoácidos, nucleósidos y neurotransmisores. Se observaron alteraciones robustas en la abundancia de metabolitos cerebrales regionales en pacientes con enfermedad de Huntington: estos incluyeron cambios en los niveles de moléculas pequeñas que desempeñan funciones importantes como intermediarios en los ciclos de Krebs y de urea, y el metabolismo de los aminoácidos. Los hallazgos apuntan a una interrupción generalizada del metabolismo cerebral e indican un fenotipo complejo más allá del gradiente de daño neuropatológico observado en el cerebro con enfermedad de Huntington. <sup>59</sup>

#### 4.5 Estudio de enfermedades cardiovasculares

De acuerdo con la OMS, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2008, se estimó que 17.3 millones de personas murieron de ECV, lo que representa el 30% de todas las muertes en todo el mundo. Además en las predicciones futuras, se calcula que en 2030 la cantidad de muertes por ECV podría

alcanzar los 23.3 millones. Las ECV son trastornos del corazón y los vasos sanguíneos, causados por aterosclerosis, que se diagnostican con mayor frecuencia en pacientes ancianos (tanto hombres como mujeres). Este grupo de enfermedades incluye: enfermedad coronaria, hipertensión, evento cerebrovascular, hipercolesterolemia, diabetes, enfermedad renal crónica, enfermedad arterial periférica y demencia vascular. A pesar de los diferentes síntomas de cada trastorno, la asociación entre ellos se relaciona con factores de riesgo (principalmente: fumar, una dieta poco saludable, la falta de actividad física que conduce a la obesidad, hipertensión arterial e hiperglucemia). Además de los factores de riesgo comunes para las ECV, la probabilidad de que un paciente diagnosticado de una ECV desarrolle otra, es muy alta. La complejidad de los mecanismos patológicos de la mayoría de las ECV todavía no se explica del todo ni se comprende completamente. Las primeras etapas del desarrollo de la aterosclerosis son en su mayoría asintomáticas, especialmente en edad temprana. Para una mejor prevención, la estratificación del riesgo para eventos cardiovasculares, el diagnóstico temprano, la selección del tratamiento adecuado y el desarrollo de nuevos fármacos han contribuido mucho a la explicación de los procesos moleculares responsables del desarrollo de la aterosclerosis.<sup>60</sup>

En el estudio metabólico de Vorkas et al, (2015) el objetivo fue desarrollar un método para obtener los compuestos acuosos y orgánicos del tejido arterial enfermo utilizando dos extracciones consecutivas, seguidas de un análisis no dirigido de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de ultra alta resolución diferente para cada extracto. Los métodos fueron elegidos y optimizados para abordar las diferentes propiedades fisicoquímicas de cada extracto: cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica para el extracto acuoso y cromatografía en fase reversa para el extracto orgánico. Se encontraron alterados los siguientes metabolitos en muestras de tejido de la placa aterosclerótica, suero y plasma, de pacientes con aterosclerosis: colesterol, purinas, pirimidinas, ceramidas, ceramidas de fosfatidiletanolamina, ácido tetracosahexaenoico, ácidos grasos poliinsaturados, ácido docosahexaenoico, glutamina, tirosina, palmitato, estearato, 1-monolinoleilglicerol, araquidonil lisolecitina, ácido docosahexaenoico, ácido hidroxicol-4-en-24-oico, ácido octadecilénico, taurina, ácido taurocólico, glucosa, piruvato; 2,3,4-trihidroxi-butirato, lactato; 3-hidroxi-butirato, acetoacetato, l-valina, l-soleucina, d-glicerol; 11-transoctadecenoato, linoleato, hexanoato, laurato, citrato, isocitrato, succinato, malato, l-glicina, l-alanina, l-serina, l-treonina, l-triptófano, l-histidina, l-prolina, l-glutamina, l-fenilalanina, l-tirosina, l-

aspartato, 4-hidroxi-l-prolina, 2-hidroxi-butirato, creatinina y glicolato.<sup>61</sup> En otro estudio de casos y controles, Yu et al, (2014) evaluaron los biomarcadores del síndrome metabólico como factor de riesgo común para las ECV, en muestras de orina se encontraron alterados: ácido nicotínico, leucina, tirosina, fenilalanina, triptófano, triglicilcarnitina, ácido cis-aconítico, cortolone-3-glucurónido y tetrahidroaldosterona-3-glucurónido.<sup>62</sup> Zhao et al, (2014) encontraron los siguientes metabolitos alterados en muestras de tejido pulmonar de pacientes con hipertensión arterial pulmonar: glucosa, sorbitol, fructosa, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato, fosfoenolpiruvato, octadecnedioato, tetradecanedioato, hexadecanedioato, adrenato [22:4n6], caproato, miristato, palmitoleato, palmitoilcarnitina, hexanoilcarnitina, octanoilcarnitina, citrato, cis-aconitato, succinato y succinilcarnitina.<sup>63</sup> Por último, en el estudio metabolómico de Wanga et al, (2011) se encontraron metabolitos alterados en muestras de orina de pacientes con hiperlipidemia para evaluar el riesgo cardiovascular en hombres jóvenes con obesidad: l-prolil-prolina, leucilfenilalanina, decanoilcarnitina, N-acetilornitina, sulfato de 17-hidroxipregnenolona, 11-hidroxiprogesterona, sulfato de 5a-dihidrotestosterona y glucosilgalactosilhidroxilisina.<sup>60</sup>

## PERSPECTIVAS

La medicina de precisión es un enfoque que plantea la integración de una serie de evidencias experimentales tales como datos clínicos, datos "ómicos" (que involucran todos los que se derivan de las tecnologías de alto rendimiento), biomarcadores, registros médicos electrónicos entre otros para dar a cada paciente un tratamiento personalizado. En este contexto la metabolómica tiene un papel importante ya permite la creación de perfiles y fenotipos metabólicos que pueden ser utilizados para predecir las respuestas de los pacientes a diferentes tratamientos. Esto puede favorecer el desarrollo de herramientas de apoyo a la toma de decisiones para pacientes y médicos con el fin de seleccionar o recomendar regímenes de tratamiento óptimos (para ser utilizados en un sentido amplio de la palabra, por lo que también incluyen cambios en el estilo de vida). La expectativa es que, mediante el uso de los "perfiles personalizados", se podrá modificar el enfoque actual comúnmente aplicado de fracaso del tratamiento y, por lo tanto, contribuir en última instancia a mejorar los resultados del paciente (Ver figura 5).<sup>64</sup>



Figura 5. Enfoque de la medicina de precisión utilizando metabolómica en comparación con el enfoque tratamiento-fracaso de la medicina basada en evidencia. Se utilizará un "perfil personalizado" basado en la metabolómica, así como otros datos clínicos y de estilo de vida para predecir las respuestas de los pacientes a tratamientos específicos y, por lo tanto, ayudar a seleccionar los mejores regímenes de tratamiento.<sup>64</sup>

La metabolómica no solamente puede contribuir en generar datos más precisos del estado fisiológico de una persona en diferentes condiciones, sino que, también puede ayudar a corroborar los datos recabados por las técnicas anteriores tales como cuestionarios o determinaciones bioquímicas.

Actualmente existen diferentes centros de investigación alrededor del mundo que brindan el servicio de análisis metabolómico. Por ejemplo la Universidad de Duke, en Durham, Carolina del Norte Estados Unidos de América, tiene un sitio web (<https://genome.duke.edu/cores-and-services/proteomics-and-metabolomics/pricing>) donde se exhibe un listado de precios con base en los servicios proporcionados a los colaboradores internos (Duke) y los externos (laboratorios académicos, gubernamentales o sin fines de lucro). En cuanto al costo de la preparación de muestras para análisis metabolómicos se incluye la precipitación con metanol (muestras de fluidos biológicos); la solubilización de muestras sólidas (células, tumor) mediante sonicación con sonda o desgarrado del tejido va de los \$26 USD para internos y \$42 USD para externos; mini ensayo Bradford (por cada placa, máximo 20 muestras) \$43 USD para internos y \$69 USD para externos; preparación para placa de farmacocinética de fluidos biológicos \$68 USD para internos y \$109 USD para externos. En promedio, cobran por muestra de análisis metabolómicos cuantitativos \$95 USD a colaboradores internos y \$152 USD a externos; por mencionar algunos de los kits que se encuentran en el listado: AbsoluteIDQ p180 Panel, Absolute IDQ p400 HR Panel, Bile Acids Panel (Biocrates, Inc.).<sup>65</sup> A manera de ejemplo; para realizar un estudio con 10 pacientes y tres réplicas, lo que equivale a 30 muestras, si son enviadas a analizar en el centro de investigación mencionado entonces tendría un costo aproximado de \$4916 USD en promedio (considerando muestras de fluidos biológicos) y \$5958 USD en promedio (considerando muestras sólidas); más gastos de envío y almacenamiento en caso de que se requiera. Por último, cabe mencionar que en México no hay centros que realicen estos servicios de análisis metabolómicos.

La base de datos MEDLINE® contiene citas de revistas (*journals*) y resúmenes para literatura biomédica de todo el mundo, accesible de manera gratuita a través del motor de búsqueda PubMed®, que proporciona enlaces a artículos de texto completo cuando sea posible y que permite conocer el impacto y las tendencias de las diferentes disciplinas de las ciencias biológicas.<sup>66</sup> En PubMed® se encuentran 5063 artículos de metabolómica publicados en todo el mundo desde el año 2002. En los últimos cinco años (enero 2014 a junio 2019) el número de publicaciones está en 3545, conformando un 70% del total. De manera local, la búsqueda en PubMed® refleja que desde el año 2010 a la actualidad, se han publicado 88 artículos sobre metabolómica en México; de los cuales, 82 tienen fecha de enero de 2014 a junio de 2019, lo que representa el 93% de las publicaciones realizadas sobre este tema en los últimos cinco años.

Finalmente es importante mencionar que en México la metabolómica es un área muy reciente, hay pocos grupos de investigación trabajando en ella, uno de los esfuerzos por impulsar esta disciplina es La Red Mexicana de Metabolómica (RMM) que fue creada en junio de 2017 y que tiene como objetivos identificar, agrupar y apoyar los diferentes grupos de investigación en Metabolómica que se desarrollan en el país, así como estimular y fomentar la participación de estudiantes y de la industria en su desarrollo, ya que es una disciplina que cada vez se hace más presente en las ciencias básica y aplicada. Además, uno de los compromisos de la RMM es promover el uso compartido de infraestructura y conocimientos entre sus afiliados. Otro cometido importante es difundir la metabolómica a nivel científico y educacional, a través de talleres, cursos y congresos. En este sentido los afiliados de la RMM recibirán alertas sobre diferentes actividades, publicaciones e innovaciones relacionados con la metabolómica que se llevan a cabo en México y en el mundo.<sup>67</sup>

## CONCLUSIONES

La metabolómica es un área emergente que permite hacer una investigación exhaustiva del metabolismo de los organismos. El uso de técnicas analíticas de nueva generación junto con las herramientas bioinformáticas, permite a los investigadores examinar las fluctuaciones en los perfiles de metabolitos en diferentes condiciones fisiológicas. Debido a que las muestras de fluidos biológicos se pueden recolectar con bastante facilidad, las variaciones de los metabolitos resultantes de las alteraciones genéticas, la enfermedad o los factores ambientales se pueden estudiar detalladamente.

Además de su importancia en la ciencia básica, la metabolómica también tiene una importancia aplicada, ya que puede llevar al diseño de nuevas técnicas de diagnóstico no invasivas, rápidas, económicas, sensibles y específicas en diferentes áreas de la medicina, especialmente en oncología. La introducción de nuevos biomarcadores en el panel de los indicadores de diagnóstico utilizados actualmente permitirá evaluar el riesgo de morbilidad relacionado con los tumores, seleccionar el tratamiento adecuado y monitorear la respuesta a la terapia empleada. Es muy importante señalar que el análisis exhaustivo del metaboloma ofrece la posibilidad de un diagnóstico de cáncer en su etapa temprana, cuando aún es susceptible de curación, lo que a su vez aumenta la posibilidad de recuperación. Sin embargo, los metabolitos que discriminan las muestras cancerosas y no cancerosas son en muchos casos comunes para diferentes tipos de cáncer, debido a que el metabolismo disfuncional es común en todos los cánceres; por consiguiente, el siguiente nivel de estudio requerirá un número mayor de estudios e investigaciones para estimar qué tan útil podría ser un biomarcador, por sí solo y/o en conjunto con otras pruebas diagnósticas.

La metabolómica también tiene un gran impacto en el desarrollo de otros campos de la biomedicina y allana el camino para nuevas estrategias de atención médica. Aunque actualmente hay retos por superar en el área tales como mejoras en las técnicas de

manipulación de muestras o bien mejores herramientas de análisis, se espera que esta tecnología "ómica", permita identificar biomarcadores clínicamente relevantes para predecir el desarrollo de muchos trastornos y contribuir a la mejora en la toma de decisiones terapéuticas. Sin lugar a dudas, esta disciplina jugará en el futuro un papel importante en la selección de una terapia adecuada que se adapte individualmente a los pacientes y ayude en la identificación de objetivos moleculares para nuevas estrategias de tratamiento. La combinación de "huellas" metabólicas y perfiles contribuirá a la realización de los objetivos de la metabolómica: primero, las alteraciones en dichas huellas se asociarán a un estado fisiológico del organismo; después se centrará en la identificación y cuantificación de metabolitos discriminantes. Este flujo de trabajo permitirá alcanzar el objetivo clínico de la metabolómica, que es la traducción de datos metabolómicos a una comprensión biológica más profunda. El desarrollo de herramientas y bases de datos bioinformáticas será útil en la interpretación biológica de los datos obtenidos. La integración de múltiples resultados "ómicos" posiblemente será una forma de obtener respuestas a preguntas no resueltas y tiene una gran promesa de mejorar la práctica médica en el futuro, especialmente el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes.

## Referencias

1. Klein, M. S. & Shearer, J. Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating Basic Research into Clinical Application. *J Diabetes Res* 2016, 3898502 (2016).
2. Stringer, K. A., McKay, R. T., Karnovsky, A., Quémerais, B. & Lacy, P. Metabolomics and Its Application to Acute Lung Diseases. *Front. Immunol.* 7, 44 (2016).
3. Beisken, S., Eiden, M. & Salek, R. M. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15, 97–109 (2015).
4. Johanningsmeier, S. D., Harris, G. K. & Klevorn, C. M. Metabolomic Technologies for Improving the Quality of Food: Practice and Promise. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 413–438 (2016).
5. Skoog, D. A., Crouch, S. R. & James Holler, F. *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*. (Cengage Learning Editores, 2008).
6. Monteiro, M. S. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance metabolomics reveals an excretory metabolic signature of renal cell carcinoma. *Sci. Rep.* 6, 37275 (2016).
7. Mlynárik, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* 529, 4–9 (2017).
8. Emwas, A.-H. M., Merzaban, J. S. & Serrai, H. Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. *Applications of NMR Spectroscopy* 93–130 (2015). doi:10.2174/9781608059621115010005
9. Fan, T. W.-M., -M. Fan, T. W. & Lane, A. N. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 92-93, 18–53 (2016).
10. Saavedra-Charca, W., Vásquez-Villalobos, V. & Rojas-Padilla, C. Analytical techniques used in food metabolomics. *Agroindustrial science* 191–210 (2015). doi:10.17268/agroind.science.2015.02.11
11. Jové, M., Portero-Otín, M., Naudí, A., Ferrer, I. & Pamplona, R. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 640–657 (2014).
12. Beger, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites* 3, 552–574 (2013).
13. Spicer, R. A., Salek, R. & Steinbeck, C. A decade after the metabolomics standards initiative it's time for a revision. *Scientific data* 4, 170138 (2017).

14. Griffin, J. L. *et al.* Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: mammalian/in vivo experiments. *Metabolomics* 3, 179–188 (2007).
15. Sumner, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211–221 (2007).
16. Rubtsov, D. V. *et al.* Proposed reporting requirements for the description of NMR-based metabolomics experiments. *Metabolomics* 3, 223–229 (2007).
17. Goodacre, R. *et al.* Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* 3, 231–241 (2007).
18. Smirnov, K. S. *et al.* Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 266–279 (2016).
19. Kusonmano, K., Vongsangnak, W. & Chumnanpuen, P. Informatics for Metabolomics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 939, 91–115 (2016).
20. Chong, J. & Xia, J. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics* 34, 4313–4314 (2018).
21. Peters, K. *et al.* PhenoMeNal: Processing and analysis of Metabolomics data in the Cloud. *Gigascience* (2018). doi:10.1093/gigascience/giy149
22. Trivedi, D. K., Hollywood, K. A. & Goodacre, R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* 3, 294 (2017).
23. Luque de Castro, M. D. & Priego-Capote, F. The analytical process to search for metabolomics biomarkers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 341–349 (2018).
24. Gowda, G. N., Nagana Gowda, G. & Raftery, D. Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics. *Current Metabolomics* 1, 227–240 (2013).
25. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95 (2001).
26. Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 451–459 (2016).
27. van Karnebeek, C. D. M. *et al.* The role of the clinician in the multi-omics era: are you ready? *J. Inherit. Metab. Dis.* 41, 571–582 (2018).
28. Yang, K. & Han, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* 41, 954–969 (2016).
29. Sethi, S. & Brietzke, E. Recent advances in lipidomics: Analytical and clinical

- perspectives. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 128-129, 8–16 (2017).
30. Ghosh, A. & Nishtala, K. Biofluid lipidome: a source for potential diagnostic biomarkers. *Clin. Transl. Med.* 6, 22 (2017).
  31. Cummings, R. D. & Pierce, J. M. The challenge and promise of glycomics. *Chem. Biol.* 21, 1–15 (2014).
  32. Davids, M. *et al.* Glycomics in rare diseases: from diagnosis to mechanism. *Transl. Res.* (2018). doi:10.1016/j.trsl.2018.10.005
  33. van Scherpenzeel, M., Steenbergen, G., Morava, E., Wevers, R. A. & Lefeber, D. J. High-resolution mass spectrometry glycoprofiling of intact transferrin for diagnosis and subtype identification in the congenital disorders of glycosylation. *Transl. Res.* 166, 639–649.e1 (2015).
  34. Lamichhane, S., Sen, P., Dickens, A. M., Orešič, M. & Bertram, H. C. Gut metabolome meets microbiome: A methodological perspective to understand the relationship between host and microbe. *Methods* 149, 3–12 (2018).
  35. Peisl, B. Y. L., Schymanski, E. L. & Wilmes, P. Dark matter in host-microbiome metabolomics: Tackling the unknowns-A review. *Anal. Chim. Acta* 1037, 13–27 (2018).
  36. Blum, H. E. The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* 62, 414–420 (2017).
  37. Ursell, L. K. *et al.* The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* 146, 1470–1476 (2014).
  38. Daliri, E. B.-M., Wei, S., Oh, D. H. & Lee, B. H. The human microbiome and metabolomics: Current concepts and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3565–3576 (2017).
  39. Cowan, T. E. *et al.* Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 489–495 (2014).
  40. Mora-Ortiz, M., Trichard, M., Oregioni, A. & Claus, S. P. Thanatometabolomics: introducing NMR-based metabolomics to identify metabolic biomarkers of the time of death. *Metabolomics* 15, 37 (2019).
  41. Dinis-Oliveira, R. J. Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel. *J. Forensic Leg. Med.* 61, 128–140 (2019).
  42. Patel, S. & Ahmed, S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107, 63–74 (2015).
  43. Xie, G. *et al.* Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer. *J.*

- Proteome Res.* 14, 1195–1202 (2015).
44. Wishart, D. S. Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease? *EBioMedicine* 2, 478–479 (2015).
  45. Boroughs, L. K. & DeBerardinis, R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology* 17, 351–359 (2015).
  46. Wishart, D. S., Mandal, R., Stanislaus, A. & Ramirez-Gaona, M. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites* 6, (2016).
  47. Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 473–484 (2016).
  48. Handa, H. *et al.* Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry. *PLoS One* 9, e114555 (2014).
  49. Garg, N. *et al.* Three-Dimensional Microbiome and Metabolome Cartography of a Diseased Human Lung. *Cell Host Microbe* 22, 705–716.e4 (2017).
  50. Khatami, F. *et al.* Oncometabolites as biomarkers in thyroid cancer: a systematic review. *Cancer Manag. Res.* 11, 1829–1841 (2019).
  51. Gu, Y. *et al.* Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *Journal of Translational Medicine* 13, 35 (2015).
  52. Asai, Y. *et al.* Elevated Polyamines in Saliva of Pancreatic Cancer. *Cancers* 10, (2018).
  53. Gray, E. *et al.* The longitudinal cerebrospinal fluid metabolomic profile of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 16, 456–463 (2015).
  54. Bjernevik, K. *et al.* Prediagnostic plasma metabolomics and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 92, e2089–e2100 (2019).
  55. Wilkins, J. M. & Trushina, E. Application of Metabolomics in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Neurology* 8, (2018).
  56. Yilmaz, A. *et al.* Diagnostic Biomarkers of Alzheimer’s Disease as Identified in Saliva using <sup>1</sup>H NMR-Based Metabolomics. *J. Alzheimers. Dis.* 58, 355–359 (2017).
  57. Liang, Q. *et al.* Metabolomics-based screening of salivary biomarkers for early diagnosis of Alzheimer’s disease. *RSC Advances* 5, 96074–96079 (2015).
  58. Chang, K.-H. *et al.* Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson’s Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 6319–6328 (2018).
  59. Patassini, S. *et al.* Metabolite mapping reveals severe widespread perturbation of multiple metabolic processes in Huntington’s disease human brain. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862, 1650–1662 (2016).
60. Kordalewska, M. & Markuszewski, M. J. Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113, 121–136 (2015).
  61. Vorkas, P. A. *et al.* Metabolic phenotyping of atherosclerotic plaques reveals latent associations between free cholesterol and ceramide metabolism in atherogenesis. *J. Proteome Res.* 14, 1389–1399 (2015).
  62. Yu, Z.-R., Ning, Y., Yu, H. & Tang, N.-J. A HPLC-Q-TOF-MS-based urinary metabolomic approach to identification of potential biomarkers of metabolic syndrome. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* 34, 276–283 (2014).
  63. Zhao, Y. *et al.* Metabolomic heterogeneity of pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 9, e88727 (2014).
  64. Beger, R. D. *et al.* Metabolomics enables precision medicine: ‘A White Paper, Community Perspective’. *Metabolomics* 12, 149 (2016).
  65. Pricing | Duke GCB. Available at: <https://genome.duke.edu/cores-and-services/proteomics-and-metabolomics/pricing>. (Accessed: 26th June 2019)
  66. About MEDLINE® and PubMed®: The Resources Guide. (2006).
  67. Quienes somos – Red Mexicana de Metabolómica. Available at: <http://rmm.metabolomics.com.mx/quienessomos/>. (Accessed: 26th June 2019)