



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
ANÁLISIS METABOLÓMICO EN MUESTRAS
DE MODELOS DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**

Autor: Paloma García Gaspar

Fecha: Junio 2020

Tutor: José Luis Izquierdo García

Índice

Resumen	2
Abstract.....	2
1. Introducción y antecedentes.....	2
<i>Etapas análisis metabolómico</i>	<i>3</i>
2. Objetivos	5
3. Material y métodos	5
4. Resultados y discusión	5
Técnicas análisis metabolómico	5
<i>Resonancia magnética nuclear</i>	<i>6</i>
<i>Espectrometría de masas</i>	<i>6</i>
<i>Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)</i>	<i>7</i>
<i>Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS)</i>	<i>7</i>
<i>Electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS)</i>	<i>7</i>
Asma	8
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	10
Cáncer de pulmón	12
Hipertensión arterial pulmonar (HAP)	13
5. Conclusiones	16
6. Bibliografía	17

Resumen

La metabolómica es el estudio de metabolitos presentes en un sistema biológico cuyo objetivo es el diagnóstico de enfermedades, en este caso, respiratorias. Los metabolitos son moléculas resultantes de la actividad celular y, por tanto, sirven como indicadores directos de esta en un momento determinado. Se pueden detectar gran número de metabolitos con pequeñas cantidades de muestra con esta herramienta.

El estudio del metaboloma se usa cada vez más en el diagnóstico clínico y esto es posible gracias a los últimos avances informáticos y tecnológicos en resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS), principales técnicas empleadas en el análisis metabolómico.

Se abordará el diagnóstico de las enfermedades respiratorias principales en este campo, como cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma e hipertensión arterial pulmonar (HAP). Las muestras utilizadas para ello son lavado broncoalveolar, condensado del aire exhalado, sangre, orina, esputos...

Palabras clave: Análisis metabolómico, RMN y MS en enfermedades respiratorias, asma, EPOC, cáncer de pulmón, hipertensión arterial pulmonar.

Abstract

Metabolomics is the study of metabolites present in a biological system whose objective is the diagnosis of diseases, in this case, respiratory diseases. Metabolites are molecules resulting from cellular activity and, therefore, serve as direct indicators of this at a given time. Large numbers of metabolites can be detected with small amounts of sample with this tool.

The study of the metabolome is increasingly used in clinical diagnosis and this is possible thanks to the latest computer and technological advances in nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), the main techniques used in metabolomic analysis.

The diagnosis of the main respiratory diseases in this field will be addressed, such as lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and pulmonary arterial hypertension (PAH). The samples used for this are bronchoalveolar lavage, condensate from exhaled air, blood, urine, sputum...

Keywords: Metabolomic analysis, NMR and MS in respiratory diseases, asthma, COPD, lung cancer, pulmonary arterial hypertension.

1. Introducción y antecedentes

El metaboloma se define como un conjunto de metabolitos de bajo peso molecular que se encuentran presentes en una célula, biofluido u organismo, ya sea a nivel cualitativo y/o cuantitativo, en unas condiciones fisiológicas determinadas. (1) A su vez, los metabolitos son moléculas resultantes de la actividad celular y por tanto sirven como medida directa de esta. (2)

Esta disciplina está suficientemente madura actualmente debido, en parte, al recibimiento de influencias de otras disciplinas ómicas como la transcriptómica y la proteómica. La

metabolómica posee generalmente un carácter más discriminante que la transcriptómica y proteómica debido a varias razones que se comentarán a continuación. Para comenzar, el número de metabolitos es inferior al de genes y proteínas, lo que se traduce en un análisis menos complejo. Para continuar, el análisis de metabolitos es más económico que el resto, lo que significa que se podrían realizar análisis con mayor frecuencia. Por último, la tecnología empleada para llevar a cabo el análisis metabolómico es más sencilla, convirtiendo a esta disciplina en una que no tiene nada que envidiar al resto de disciplinas ómicas. (1) A pesar de las numerosas ventajas, no está exenta de algunas dificultades, entre ellas la multitud de metabolitos existentes y la variación de propiedades fisicoquímicas de estos por su presencia en tejidos o fluidos biológicos. (3)

Los dos estudios pioneros en el campo de la metabolómica tan solo se publicaron con un año de diferencia a finales de los años noventa. El primero fue publicado en el año 1999 por Nicholson y su equipo en el Imperial College, quienes definieron el término metabonómica y el uso de la técnica RMN en fluidos biológicos. (4) El segundo se publicó en el año 2000 por Fiehn y su equipo del instituto Max-Planck, quienes trataron el término metabolómico en plantas utilizando GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas). (5) (3)

Al principio las investigaciones se centraban más en la descripción de desarrollos tecnológicos, sin embargo, actualmente se les da un papel más importante al área de la medicina, el análisis de alimentos y la biología. (3) El objetivo principal de esta disciplina es poder integrar los resultados en bases de datos para un mejor diagnóstico y desarrollo de modelos predictivos, en este caso, en enfermedades respiratorias. (1) Para ello es muy importante la detección de la huella dactilar metabólica, es decir, la identificación de los biomarcadores de la enfermedad. (6)

Etapas análisis metabolómico

Antes de explicar la detección de metabolitos, principalmente con RMN o MS, hay que centrarse primero en las etapas que la anteceden, mostradas en un esquema que se expone a continuación (**Figura 1**).

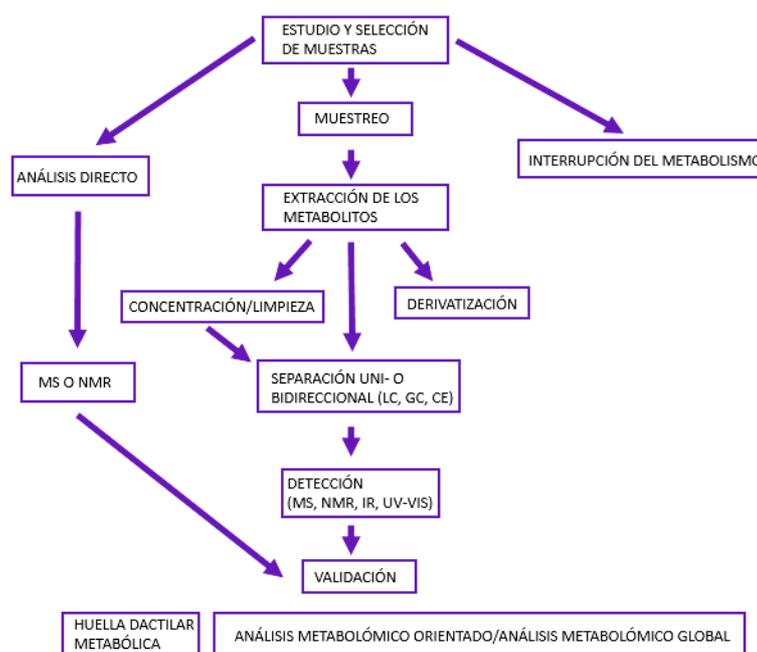


Figura 1. Esquema general de las principales etapas implicadas en el proceso analítico metabolómico. (1)

Para comenzar, hay que elegir el tipo de estudio y para ello se puede realizar una aproximación dirigida o no-dirigida. En el primer caso, se conocen los metabolitos de interés implicados y se puede realizar una simple medida con RMN siempre y cuando haya cantidad suficiente de metabolitos o, por el contrario, una técnica mucho más sensible para casos donde haya baja concentración de metabolitos como es la MS con triple cuadrupolo con la opción de monitorización de iones/transiciones selectivos (MRM). En el segundo caso, debido a que se desconoce qué metabolitos son de interés, se deben utilizar técnicas analíticas que sean complementarias entre sí como por ejemplo la cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS), aunque la RMN también ha sido utilizada en muchos casos. (2) La aproximación no-dirigida permite profundizar más en el conocimiento biológico y cada vez está siendo más utilizada para la identificación de dianas terapéuticas, el desarrollo de nuevos fármacos y la investigación de procesos bioquímicos implicados. (2)

La selección de la muestra es sin duda una de las etapas críticas en el análisis metabolómico. La mayoría de muestras biológicas utilizadas son suero/plasma y orina debido a que ambas son un reflejo directo del metabolismo de un organismo. (1) En este caso, todas las muestras derivadas del tracto respiratorio (lavado broncoalveolar, condensado del aire exhalado, esputos...) serían complementarias a las citadas anteriormente.

A continuación se realiza el muestreo y el almacenamiento de la muestra en biobancos (cuando no es posible el análisis inmediato), siendo este otro punto crítico del análisis. (1) Durante el proceso de muestreo, el metabolismo se interrumpe de forma eficiente mediante la inhibición de enzimas endógenas para poder obtener las muestras representativas en metabolómica. Esta interrupción del metabolismo debe cumplir los siguientes requisitos: debe ser más rápida que los cambios metabólicos que suceden en la muestra y no debe inducir a variaciones en la concentración de metabolitos. Nunca se puede ver comprometida la integridad de la muestra y esta tiene que ser compatible con el resto de etapas del análisis metabolómico. Las técnicas principales empleadas para la interrupción del metabolismo se basan en cambios bruscos de pH o temperatura, por ejemplo, empleando metanol a -20°C o nitrógeno líquido a -196°C . (1)

Otra de las etapas críticas en este proceso es sin duda la extracción de metabolitos, cuyos objetivos son: aislar los metabolitos de la muestra, eliminar interferencias, obtener un extracto compatible con la técnica analítica requerida y concentrar metabolitos que se encuentren en trazas. (1) Se suele realizar con bastante frecuencia la derivatización en GC-MS, cuyo objetivo es incrementar la volatilización de metabolitos para una óptima extracción de estos. (1)

La técnica utilizada para la extracción de muestras líquidas varía dependiendo del tipo de muestra. Se utiliza MS (espectrometría de masas), LC-MS (cromatografía de líquidos acoplada a MS) o CE-MS (electroforesis capilar acoplada a MS) únicamente en los casos de orina, dializados y fluidos digestivos. Con el suero y plasma se utiliza LLE (extracción líquido-líquido) o SPE (extracción en fase sólida), debido a que la alta concentración de proteínas que presentan podría interferir en la detección de metabolitos con las primeras técnicas mencionadas. (1)

En el caso de las muestras sólidas, se utilizan técnicas para obtener un polvo homogéneo utilizando morteros, molinos de bolas, Ultra Turrax, etc. Es imprescindible la buena realización de esta etapa sobre todo en tejidos vegetales, cuya pared celular debe romperse para la correcta obtención de metabolitos. (1)

La extracción de metabolitos a partir de células puede realizarse de manera simultánea o secuencial. En el primer caso, la disolución empleada en la interrupción del metabolismo sirve

como extractante, mientras que en el segundo caso las células se aíslan del medio de cultivo y posteriormente se extraen con un extractante adecuado. Una vez extraídos los metabolitos, hay que proceder a la eliminación del disolvente empleado y para ello la técnica más utilizada es la evaporación en condiciones de vacío. (1)

Finalmente llega la etapa de detección analítica, basada en el uso de la RMN (resonancia magnética nuclear) y la MS (espectrometría de masas), la cual se explicará con detalle más adelante debido a la importancia que supone. Tras ello, lo idóneo sería la creación de una huella dactilar metabólica basada en la detección de biomarcadores, (6) con el objetivo de utilizarla en un futuro para la prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades, en este caso concreto, respiratorias. (7)

2. Objetivos

No es muy usual tener conocimientos del uso de metabolómica en el diagnóstico clínico de enfermedades respiratorias, sin embargo, es una disciplina que está creciendo cada vez más gracias a la expansión de la tecnología y la informática. Es por ello, que los objetivos de este trabajo bibliográfico son los que se definen a continuación:

1. Adquirir conocimientos con exactitud acerca del análisis metabólico.
2. Conocer las técnicas más utilizadas de esta disciplina en las enfermedades respiratorias: RMN y MS.
3. Estudiar el desarrollo actual y las perspectivas de futuro con detenimiento en asma, EPOC, cáncer de pulmón e hipertensión arterial pulmonar.

3. Material y métodos

La realización de este trabajo bibliográfico se ha basado en la utilización de material informático como revistas de investigación científica, artículos científicos, libros e internet, siendo este último fundamental para la búsqueda de los mismos. Todo ello se ha realizado buscando en bases de datos, tales como “PubMed”, “Google Scholar” y “Elsevier” utilizando términos como “RMN y MS en enfermedades respiratorias”, “Metabolomic analysis in asthma” y “COPD metabolic analysis”, entre otros.

4. Resultados y discusión

Técnicas análisis metabólico

Debido a la complejidad química del metaboloma, la elección de las técnicas analíticas no es un trabajo fácil pero debe estar basada en una solución de compromiso entre selectividad química, velocidad, sensibilidad instrumental y, obviamente, disponibilidad de la instrumentación. Es por ello que se suelen utilizar varias tecnologías de modo simultáneo proporcionando así una visión global y más detallada de los metabolitos involucrados. (3)

Para la detección del metaboloma, en este caso útil para el análisis de enfermedades respiratorias, las dos técnicas pioneras utilizadas son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). Las técnicas separativas más empleadas son las mostradas a continuación, siempre acopladas con la MS: GC (cromatografía de gases), LC (cromatografía de líquidos) y CE (electroforesis capilar). (3)

Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico que consiste básicamente en medir la absorción de la radiación de radiofrecuencia que experimenta una muestra situada en un campo magnético fuerte, obteniéndose con ello un espectro de RMN. (8) Se trata de una técnica rápida, robusta, no destructiva, usa tecnología “*high-throughput*” (de alto rendimiento), siendo así la herramienta predominante para la determinación del perfil metabólico. (3) A continuación se muestra un ejemplo de espectro de este tipo (**Figura 2**).

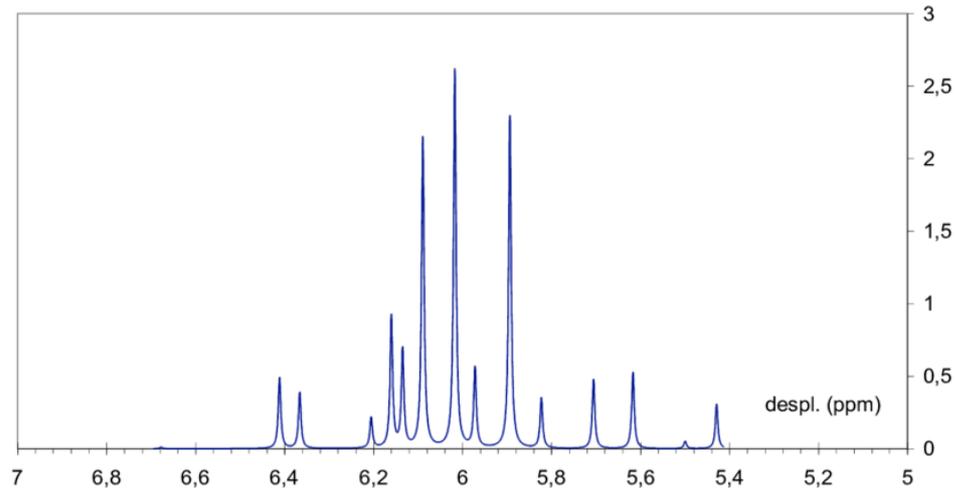


Figura 2. Espectro simulado de RMN de protón del cianoeteno a 60 MHz. (9)

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental basada en la separación de los iones procedentes de especies moleculares y atómicas, en función de su relación masa/carga. Los resultados obtenidos se representan en un gráfico denominado espectro de masas, característico de cada especie. (10) A continuación se muestra un ejemplo (**Figura 3**).

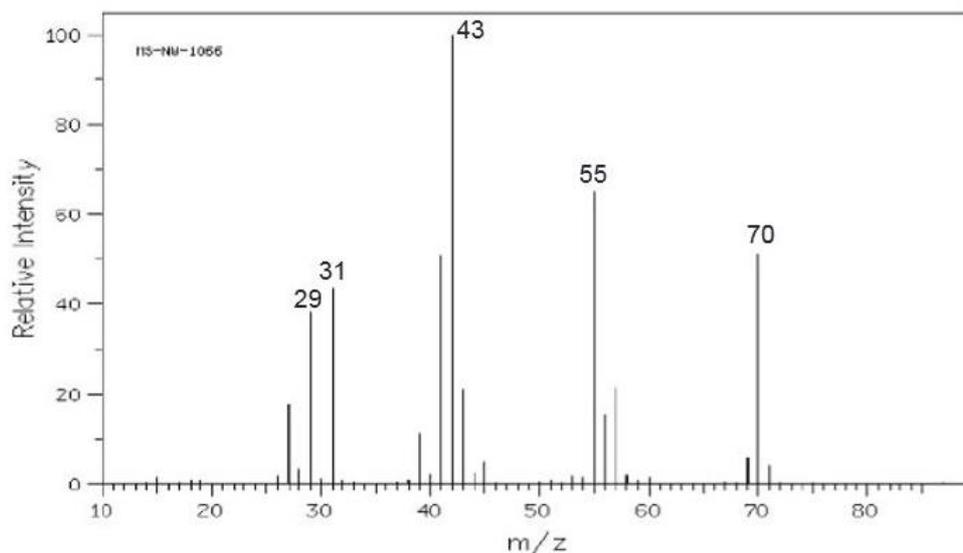


Figura 3. Espectro de masas del pentan-1-ol. (11)

Tiene alta sensibilidad y selectividad, siendo capaz de detectar sustancias “invisibles” a RMN. (3) Se puede utilizar directamente sin necesidad de poner delante una técnica separativa (experimentos de infusión directa), sin embargo, si la acoplamos a técnicas de este tipo de alta resolución, como GC, LC o CE, obtendremos una mejora sustancial, aumentando la información del metaboloma bajo estudio y cubriendo información no accesible mediante el empleo de RMN o MS (sin separación previa). El resultado obtenido de un espectrómetro de masas depende de la interfase (o fuentes de ionización) y del analizador utilizado. (3)

A continuación, se explicarán las técnicas separativas de alta resolución acopladas a la MS.

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Técnica analítica basada en la volatilización de la muestra (fase móvil) y su posterior inyección en una columna cromatográfica (fase estacionaria) para la separación de analitos. (12) Se considera la técnica estrella en determinación del perfil metabólico, ya que combina alta resolución y sensibilidad, tiempos de análisis razonables... todo ello unido a la capacidad intrínseca que tiene la MS de poder identificar cualquier sustancia pura de manera casi inequívoca. Esta técnica, tal y como es de esperar, solo es apta para analitos volátiles y térmicamente estables. Las fuentes de ionización más utilizadas son las de impacto electrónico e ionización química. La elección de una u otra recae en la disponibilidad de bases de datos comerciales y en la posible fragmentación del compuesto. (3)

Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS)

Técnica analítica que consiste en la fluidez de un líquido (fase móvil) a través de una columna cromatográfica (fase estacionaria) para la separación analítica. (13) Esta técnica es más joven que la anterior y consiste en la separación de distintas clases de compuestos sin necesidad de derivatización previa. Puede usarse de varias formas pero la más utilizada es la cromatografía de partición o reparto (en fase inversa). La técnica convencional es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), sin embargo, también existe la cromatografía líquida de eficacia ultra alta (UHPLC), la cual se utiliza en esas ocasiones en las que el tamaño de partícula es inferior a 2 micrómetros, tamaño que no es soportado por HPLC. Ambas se usan para analitos que no sean muy polares, pero si lo que se necesita es la detección de analitos muy polares se podría realizar la cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). (3)

Electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS)

Se trata de otra técnica analítica que permite separar y cuantificar analitos, pero en este caso a una amplia gama de estos. (14) Tal y como se ha comentado anteriormente, el uso de GC queda limitado a metabolitos volátiles y térmicamente estables y el uso de LC en fase inversa no retiene metabolitos muy polares, por tanto, esto hace de la electroforesis capilar una buena herramienta complementaria cuando se presentan estos inconvenientes. Los campos más interesantes a los que se les está prestando más atención con CE-MS son la construcción de nuevos sprayers, el empleo de capilares recubiertos o “reellenos”, el uso de estrategias de pre-concentración de la muestra y la combinación de CE con nuevas fuentes de ionización y espectrómetros de masas de altas presiones. (3)

Todas las técnicas mencionadas anteriormente pueden ser utilizadas para el análisis metabolómico de enfermedades respiratorias. Dicha afirmación queda reflejada perfectamente con la descripción de las cuatro enfermedades respiratorias primordiales en este campo: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón e hipertensión arterial pulmonar (HAP).

Asma

Enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la obstrucción reversible de las vías aéreas inferiores. (15) Los síntomas y signos clínicos de sospecha del asma son sibilancias (el más característico), disnea (o dificultad respiratoria), tos y opresión torácica. Su diagnóstico se basa en parte en la aparición de estos signos clínicos y síntomas, sin embargo, estos son inespecíficos y por ello se necesitan pruebas objetivas diagnósticas, además de la realización de una serie de preguntas incluidas en las guías terapéuticas. (16)

La metabolómica en asma es una técnica relativamente nueva pero ha demostrado ser una tecnología aceptable, reproducible y clave en la identificación de biomarcadores derivados de orina o aliento con fines de diagnóstico. (17) Un importante estudio realizado por varias instituciones académicas de Singapur, China y Massachusetts (17) expone claramente los metabolitos y células implicadas en el desarrollo de la enfermedad y la importancia de su detección para el diagnóstico clínico.

En este caso, la muestra analizada para el estudio, junto con muestras de orina, fue fluido de lavado broncoalveolar (BALF) y para su detección se utilizó cromatografía líquida y cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas. El BALF se obtuvo enjuagando los pulmones con volúmenes de solución fisiológica constantes. Dicho experimento fue apoyado por un análisis estadístico en el que se usaron diversas pruebas tales como ANOVA unidireccional, prueba de Dunnett y OPLS-DA, utilizando el software SIMCA-P versión 11.0. También se realizaron la prueba de Wilcoxon y de Mann-Whitney utilizando MultiExperiment View V4.6.1. (17)

El objetivo de este estudio fue analizar los cambios del metabolismo pulmonar en asma alérgica utilizando ratones BALB/c (cepa de ratón albino muy utilizada en laboratorios (18)), a los cuales se les había sensibilizado con ovoalbúmina (OVA) para un posterior desarrollo de asma experimental. Una vez desarrollada la enfermedad, se procedió a administrar dexametasona para el estudio de los efectos de los corticosteroides sobre el metabolismo pulmonar. (17)

Tras el análisis metabolómico en pulmones asmáticos, se observó un aumento de lactato, malato y creatinina (metabolitos energéticos) en células inflamadas pulmonares, estando relacionado dicho aumento con una mayor demanda de energía debido a la inflamación en vías respiratorias. Se observó una disminución en el caso de manosa, galactosa y arabinosa, debido a su descomposición en lactato y malato para producir más energía. Además, la manosa y el arabinogalactano presentan efectos protectores en asma alérgica. En el caso del metabolismo lipídico, se observó una disminución de fosfatidilcolinas, diglicéridos, triglicéridos, colesterol, cortisol y ácido cólico. La fosfatidilcolina aumenta las funciones pulmonares, los triglicéridos son antioxidantes y citoprotectores, mientras que la colina y hexadecenoilcolina producen una respuesta adaptativa en pulmones asmáticos para controlar la gravedad de la inflamación. Se ha visto también que el descenso de niveles de cortisol (metabolito del cortisol endógeno) sugiere un posible efecto amortiguador en el metabolismo del cortisol y con ello una característica importante en el desarrollo del asma. (17)

El patrón inflamatorio característico de la mayoría de los pacientes asmáticos cursa con un aumento del número de mastocitos, neutrófilos, eosinófilos activados, células NK y linfocitos T helper tipo 2, los cuales liberan mediadores que ocasionan los síntomas de la enfermedad. (16) Se observó que sí existía un desarrollo de la inflamación de vías respiratorias inducida por la administración de OVA con un aumento de eosinófilos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. (17)

Al tratarles con dexametasona se suprimió el reclutamiento de eosinófilos, macrófagos y linfocitos pero fue ineficaz con la represión de neutrófilos. A su vez, se pudieron revertir algunos cambios metabólicos pero no ocurrió lo mismo con los niveles de lactato, malato y creatinina, además indujo cambios metabólicos adicionales. Dichos cambios se observaron comparándolos con un negativo control formado por aerosol salino. (17)

Tras el análisis multivariante de la huella digital metabólica (llevado a cabo en ratones sanos, sensibilizados, con asma y con asma tratados con dexametasona) se observaron más de 80 picos con GC-MS en al menos el 90% de las muestras. Del mismo modo, fueron recolectados más de 300 picos tanto en modo positivo como negativo con LC-MS. Las mediciones de metabolitos múltiples, conocidos como firma metabólica, versus el uso de un único metabolito, como se demostró con este estudio, permitieron la discriminación entre animales enfermos y animales sanos control. (17)

El asma es muy común en niños y por ello es importante que se les dedique especial atención. Es muy frecuente la presencia de reacciones alérgicas acompañando al asma en este sector poblacional. (19) Estudios italianos demostraron una vez más la capacidad de los análisis metabólicos para realizar un diagnóstico adecuado, utilizando RMN a partir del condensado de aire exhalado (EBC). Dichos estudios, junto con la medición de FEV1 y FeNO, se realizaron en niños con asma (diferenciando entre niños con asma persistente e intermitente tratados con corticosteroides) y sanos. Los resultados mostraron una clara diferencia entre grupos, detectándose señales de compuestos acetilados y oxidados en niños con asma, los cuales eran ausentes en niños sin dicha enfermedad (20) (**Figura 4**).

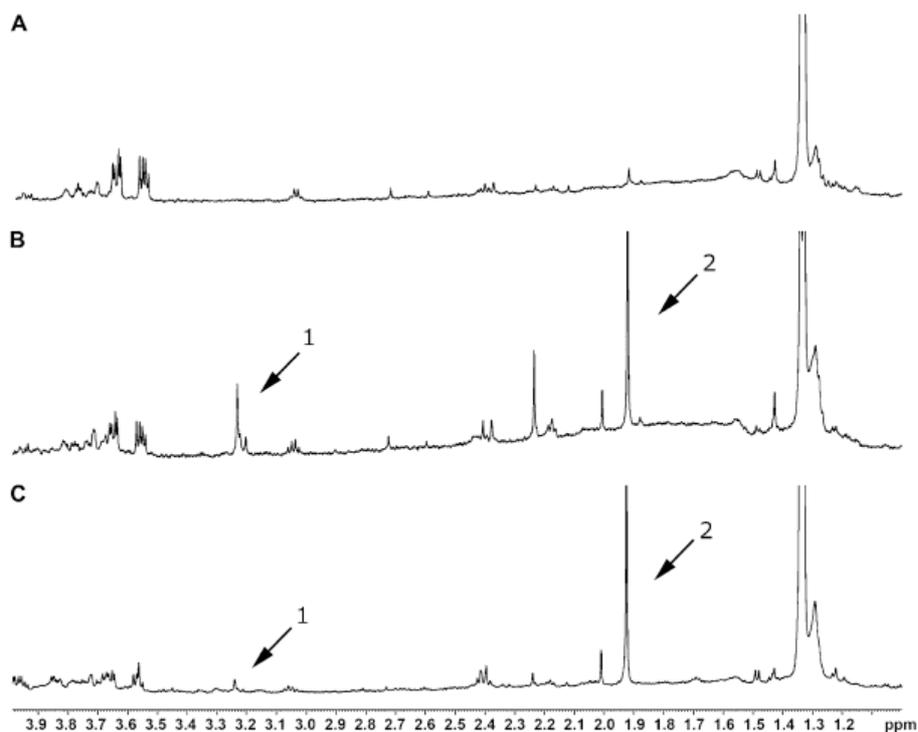


Figura 4. Ejemplos de espectros de resonancia magnética nuclear en niños con asma (B y C) y sanos (A) a partir de EBC. La señal 2 encontrada entre 1,7-2,2 ppm sugiere la presencia de compuestos acetilados y la señal 1 encontrada entre 3,2-3,4 ppm la de compuestos oxidados. (20)

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

Trastorno que cursa con obstrucción progresiva del flujo aéreo, parcialmente reversible, caracterizado por la inflamación de las vías aéreas y efectos sistémicos que se observan en adultos mayores de cuarenta años. (15) Dicho trastorno produce la obstrucción de bronquios (bronquitis crónica) y la destrucción del pulmón (enfisema pulmonar). (21) Es muy importante el diagnóstico precoz en este caso para un tratamiento eficaz y por ello sería ideal establecer una huella metabólica de dicha enfermedad.

El consumo de tabaco es la causa principal de EPOC y aun así muchos pacientes diagnosticados no consiguen abandonar el hábito tabáquico. No se conoce con exactitud la causa por la que algunos fumadores desarrollan EPOC pero se cree que está relacionado con la predisposición genética. Es muy importante por todo lo comentado que se deje inmediatamente de fumar al ser diagnosticado, ya que es la única medida eficaz demostrada para detener la evolución progresiva de esta enfermedad. (22)

Un estudio reciente realizado por una colaboración entre institutos y hospitales estadounidenses y españoles demuestra la variabilidad del metaboloma en pacientes enfermos con EPOC, distinguiéndolos en sexo, edad, supervivencia a la enfermedad e historial de tabaquismo. El estudio se llevó a cabo mediante muestra de plasma durante 3 años en 90 pacientes enfermos con EPOC y 30 pacientes controles. Entre los enfermos, 30 sobrevivieron y 60 no lo hicieron, dividido este último en dos grupos de 30 personas: los descubiertos y los validados, utilizando este último como validación posterior del análisis. En el grupo control 12 personas eran fumadoras y 18 no lo eran. Dicho procedimiento se llevó a cabo con la utilización de cromatografía de líquidos (LC-MS, LC-MS²) y cromatografía de gases (GC-MS), ambas acopladas a MS. Se realizaron dos análisis estadísticos diferentes complementarios (Support Vector Machine (SVM) y Random Forest (RF)) que sirvieron de base para contrastar los resultados. (23)

Como era de esperar, los pacientes sobrevivientes tuvieron mejor función pulmonar, calidad de vida, capacidad de ejercicio, intercambio de gases y el índice BODE (indica pronóstico de EPOC) fue menor. (23)

Se encontraron con un total de 244 metabolitos bioquímicos. En la comparación entre pacientes que sobrevivieron a la enfermedad y los que no lo hicieron, se pudo predecir la supervivencia gracias a la presencia de 4 metabolitos: fructosa, hexadecadenionato, hwesaxx (derivado del fibrinógeno) y oxalato. Es cierto que el número de pacientes era bajo y esto pudo ser causa del reducido número de metabolitos en común encontrados pero se pudo observar una alta validez debido a una cohorte de validación confirmatoria. (23)

Se observaron diferencias significativas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), en especial en la acumulación de varios intermediarios: alfa-cetoglutarato, succinato, fumarato y malato. También se observaron cambios bioquímicos en el metabolismo de la glucosa con el aumento de niveles de lactato, glicerato y fructosa. Se pudo demostrar una acumulación de intermediarios en la ruta de las pentosas fosfato y en la vía de glicerolípidos. Se pudo observar también una reducción de aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina. Todas estas anomalías, a pesar de no ser confirmadas por el grupo de validación, pudieron asociarse a un estado alterado de estrés oxidativo. (23)

Un aumento en niveles circulantes de polipéptidos asociados al fibrinógeno fue otra de las variaciones halladas durante el estudio, siendo dicho aumento observado en los pacientes que no pudieron sobrevivir a EPOC. Lo mismo ocurrió en el caso de la bradiquinina, metabolito

implicado en la activación del Factor XII y por ende, responsable de un aumento del riesgo de exacerbación y mortalidad asociado al fibrinógeno. Atendiendo a la escala de clasificación GOLD, sí se mostraron diferencias significativas entre pacientes en estadios III y IV en comparación con los controles, pero no entre pacientes en estadio II. (23)

De este estudio se hallaron 3 puntos novedosos:

- Sí que existen diferencias en el perfil metabólico durante 3 años entre personas que mueren y las que no con EPOC. (23)
- Las diferencias de metabolitos permitieron realizar una correcta clasificación de los pacientes. (23)
- La mitocondria juega un papel muy importante, ya que se detectaron varias interrupciones en vías metabólicas, en concreto en el metabolismo energético. (23)

Otros estudios que anteceden a este demuestran lo anteriormente expuesto y además añaden otros datos cruciales para el diagnóstico precoz de EPOC. Este es el caso de M.Rodríguez-Aguilar y col. que analizaron la huella química de la enfermedad a partir de condensado de aire exhalado (EBC) utilizando cromatografía de gases ultrarrápida con un detector de nariz electrónica HERACLES II (Alpha MOS). La nariz electrónica posee unos nanosensores que reaccionan con las distintas fracciones de compuestos orgánicos volátiles (COV) de la respiración, originándose así respuestas útiles para la creación de la huella dactilar metabólica de EPOC. (24) A continuación se muestran algunos de los metabolitos que difieren entre pacientes con EPOC y sanos gracias a la huella química obtenida a partir de la nariz electrónica (Figura 5).

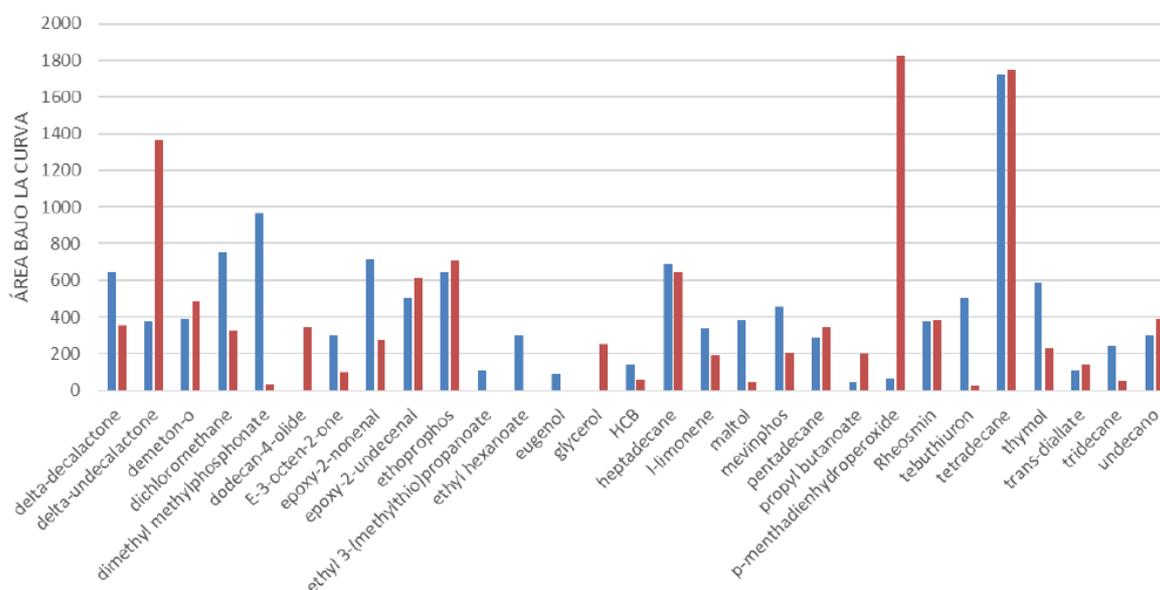


Figura 5. Compuestos encontrados en el aliento exhalado de pacientes con EPOC vs Sanos. (24)

Para concluir, es más que evidente que varias vías metabólicas están involucradas en el momento de diferenciación entre enfermos y sanos. Dichas variaciones se observan sobre todo en el metabolismo energético, que está asociado al transporte de oxígeno y a la disfunción celular, y también en la cascada de coagulación. (23)

Cáncer de pulmón

Es una enfermedad producida por la multiplicación incontrolada de las células pulmonares. Este puede desarrollarse por su origen en tracto respiratorio o a partir de una metástasis (25), siendo esta la diseminación de células cancerosas a través de sangre o linfa procedentes de otras partes del cuerpo donde se encuentra el tumor original. (26) Atendiendo a la morfología de las células cancerosas, existen dos categorías para clasificar esta enfermedad: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas. La proporción existente de ambos tipos es 4:1. (27) Desafortunadamente, este tipo de cáncer es diagnosticado en un estadio avanzado en gran parte de los pacientes, esto junto con el consumo de tabaco son los dos principales factores de riesgo a los que hay que prestarle atención. Es por ello que el objetivo principal para el diagnóstico precoz apunta actualmente a la búsqueda de biomarcadores y aquí adquiere un papel muy importante el estudio de vías metabólicas implicadas en la patogénesis de la enfermedad. (28)

Ha pasado aproximadamente una década desde que comenzó a usarse la metabolómica en la investigación del cáncer y en especial los últimos años son los que han dotado a esta de jugar un importante papel en el diagnóstico del cáncer de pulmón. Existe un concepto muy curioso e innovador en los últimos años denominado medicina de precisión, la cual estudia las influencias del medio ambiente, de la genética y de los estilos de vida de cada individuo. Esta disciplina se ha convertido usual en el diagnóstico del cáncer de pulmón de células no pequeñas. (27)

Las principales muestras que se recogen para el análisis son suero, plasma y orina aunque al ser una enfermedad del tracto respiratorio, también podrían obtenerse muestras de esputo, concentrado de espiración y lavado broncoalveolar líquido (BALF). (27)

Son muchos los biomarcadores que forman parte de la patogénesis de este cáncer, sin embargo, actualmente se pueden clasificar en cuatro categorías: metabolitos relacionados con la energía, aminoácidos y proteínas, metabolitos relacionados con la síntesis de membranas celulares y metabolitos relacionados con el microbioma intestinal. (27)

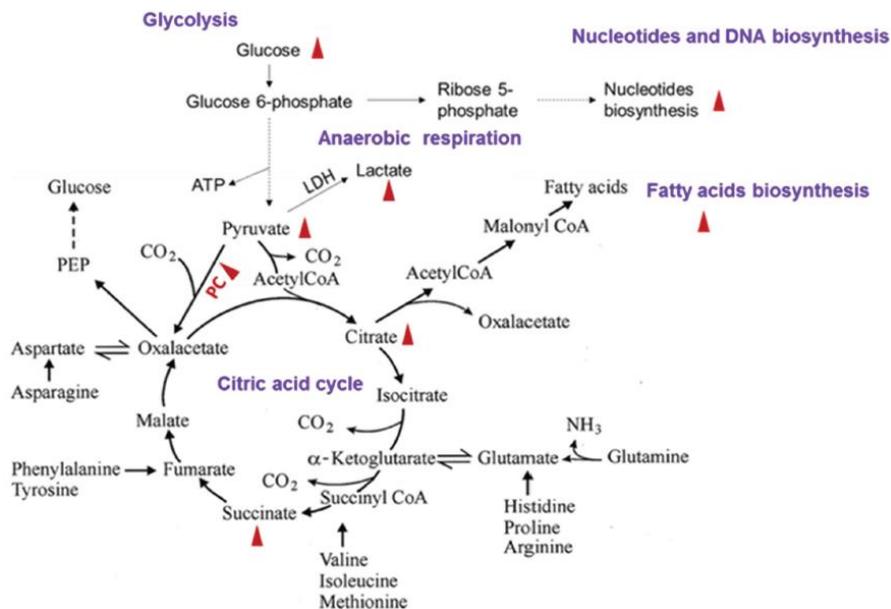


Figura 6. Regulación al alza del ciclo del ácido tricarboxílico, de la glucólisis y de las vías de síntesis de ácidos grasos y nucleótidos en las células de cáncer de pulmón. El triángulo rojo significa que la concentración de metabolito aumentó significativamente en los tejidos de cáncer de pulmón. La flecha punteada representa reacciones intermedias de varios pasos. (27)

Para comenzar se expondrán los principales metabolitos relacionados con la energía, tales como glucosa, ácido cítrico y acilcarnitinas, todos ellos aumentados en el cáncer de pulmón. (27) Por un lado, la glucosa y el ácido cítrico son en parte responsables del crecimiento de las células tumorales pulmonares, ya que regulan positivamente la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Estas son las principales vías para la obtención de energía ATP celular y son promotoras de la síntesis de ácidos grasos y nucleótidos produciéndose así la proliferación de las células del cáncer de pulmón. La enzima carboxilasa pirúvica es un punto clave en la regulación al alza de las dos vías anteriores y es importante en la fase temprana de la proliferación de células no pequeñas del cáncer de pulmón. Por otro lado, las acilcarnitinas son unas proteínas involucradas en la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias, principal fuente de energía celular, con todo lo que eso conlleva. (27)

La treonina, la alanina y el ácido glutámico son aminoácidos y proteínas consideradas fuentes importantes de nitrógeno para las células cancerígenas, presentes en mayor proporción en cáncer de pulmón. Además el ácido glutámico es también fuente de carbono para la anaplerosis del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, siendo este, por tanto, partícipe del crecimiento celular incontrolado que caracteriza estas enfermedades. (27)

En el caso de los metabolitos relacionados con la síntesis de membrana celular, están aumentados y son la colina, la carnitina y los ácidos grasos. La colina es un punto inicial para la síntesis de lípidos, la cual participa también en la síntesis de las membranas celulares durante la rápida propagación de las células cancerosas y además añade grupos metilos en la metilación del ADN, acción que puede interferir con la reparación de este. El glicerol también intervendría en el desarrollo de dicho cáncer debido a su participación en la biosíntesis de lípidos y glicerofosfolípidos de membrana. (27) El ácido láctico también se considera marcador metabólico debido a su participación en la disminución del pH extracelular, en la metástasis de células cancerosas, en la inmunosupresión de tejidos vecinos al tumor y en la proliferación de este. Esto fue demostrado por un estudio llevado a cabo mediante RMN por Rocha y col. (29) y confirmado por Chen y col. (30) (27)

Por último, tras estudios recientes, se ha encontrado una relación en pacientes con disbiosis en el microbioma intestinal y cáncer de pulmón. Otro hallazgo fundamental es el papel del benzaldehído como metabolito diferenciador entre pacientes con cáncer de pulmón y pacientes sanos. (27)

El análisis metabólico, además de demostrar la relación de estos metabolitos con el cáncer de pulmón, también diferencia entre los distintos tipos de cáncer de pulmón. Por ejemplo, Rezola y col. demostraron diferencias metabólicas como glicerina, acetona y ácido acetoacético entre el carcinoma de células escamosas de pulmón y adenocarcinoma de pulmón. (31) (27)

Hipertensión arterial pulmonar (HAP)

Se trata de una enfermedad crónica caracterizada por un aumento de resistencia vascular pulmonar (RVP) a nivel de la arteriola pulmonar. Posteriormente se produce una sobrecarga progresiva de esta, seguida de la disfunción del ventrículo derecho que puede derivar en insuficiencia cardiaca derecha y muerte. (32) La presencia de esta enfermedad se confirma con la elevación sostenida de la presión arterial pulmonar con valores por encima de 25 mm Hg en reposo o por encima de 30 mm Hg en el ejercicio, con una presión media del ventrículo izquierdo al final de cada diástole por debajo de 15 mm Hg. (33)

No es muy frecuente ver el uso de RMN o MS en HAP pero sí se han descrito en algunas ocasiones. Este es el caso por ejemplo de un equipo de estudio realizado en hospitales y otros centros de Reino Unido, los cuales analizaron metabolitos plasmáticos utilizando cromatografía líquida de ultra rendimiento en pacientes con HAP idiopática o hereditaria y sujetos control sin esta enfermedad. Estos estudios experimentales fueron complementados con análisis estadísticos como la prueba de Mann Whitney, prueba de Kolmogorov-Smirnov, regresión lineal, análisis de regresión de Cox, modelo de PLS-DA y prueba de Fisher. (34)

En dicho estudio se llevaron a cabo 3 análisis (cada uno con su grupo de pacientes con HAP y controles) y se encontraron 686 metabolitos, de los cuales 97 (independientes de edad, sexo, origen étnico, índice de masa corporal, creatinina (indicador de función renal), bilirrubina (indicador de función hepática) y farmacoterapia) distinguían entre pacientes con HAP y sanos. Dentro de este grupo, se cuantificaron 53 metabolitos tales como sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), metionina sulfona, N1-metiliosina, oleoilcarnitina, palmitoilcolina y esfingomielina. (34)

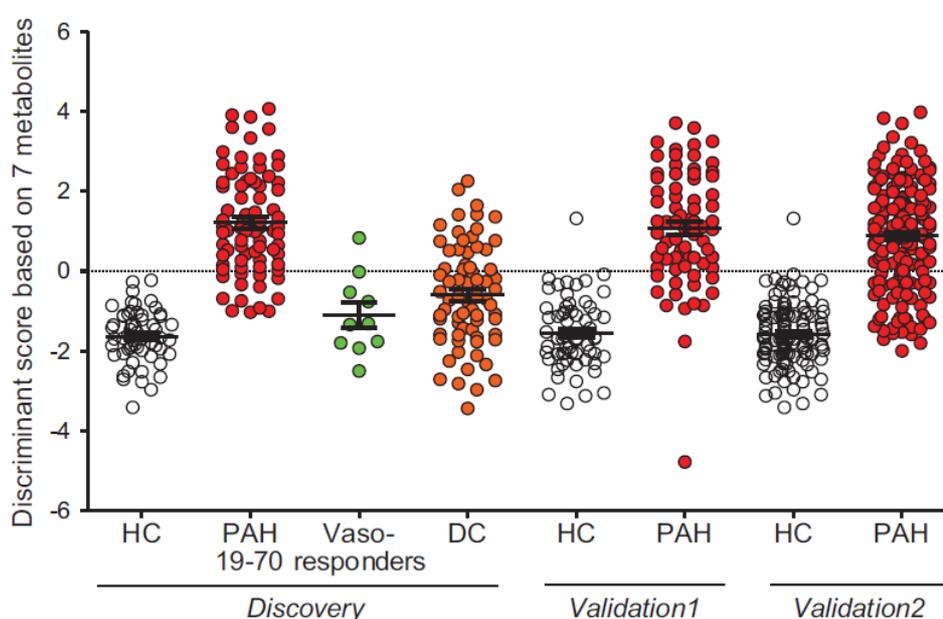


Figura 7. Modelos de análisis discriminantes basados en un bajo número de metabolitos distinguen a los pacientes con hipertensión arterial pulmonar (HAP) de los sujetos control. Gráfico de puntos que muestra las puntuaciones del modelo de sujetos individuales para sujetos de control sanos (HC), pacientes con HAP, vasorespondedores y sujetos de control de enfermedades (DC) en análisis de descubrimiento y validación. (34)

Pero el dato más importante respecto a ello es el hallazgo de 20 metabolitos específicos de los 53 en pacientes con HAP tales como N-acetilaspártato, octadecanodioato y palmitoilcolina. Se encontraron dos metabolitos fundamentales en su fisiopatología: N2,N2-dimetilguanosina y malato. También se observó en este grupo un aumento de purina, poliamina y metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y una reducción de esteroides, fosfatidilcolinas y esfingomielinas, asociando dichos metabolitos a la clínica característica de la enfermedad. (34)

El aumento de N1-metiliosina y N2,N2-dimetilguanosina (nucleósidos modificados) son un reflejo de la regulación del aparato transcripcional incluyendo el recambio de ARNt.

En pacientes con HAP se han asociado estas modificaciones a los cambios en la traducción de proteínas relacionadas con la enfermedad pulmonar. (34)

Por un lado, tal y como se indicó anteriormente, en esta enfermedad se observan alteraciones significativas en vías relacionadas con la producción de energía, con la acumulación de acilcarnitinas, glutamato e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Al acumularse estos metabolitos se puede producir un fallido intento por parte del organismo por aumentar la utilidad de ácidos grasos mediante la beta-oxidación, originándose así una sobrecarga en el ventrículo derecho que deriva en cambios electrofisiológicos cardíacos y arritmias. Otros metabolitos energéticos alterados observados en pacientes con HAP han sido el citrato, el succinato y algunos ácidos grasos. La reducción de fosfatidilcolina y esfingomielina está relacionada con un aumento de mortalidad en pacientes con HAP. (34)

Por otro lado, dentro de esos 686 metabolitos iniciales encontrados, 62 se pueden usar como valores de corte óptimos para el pronóstico y la identificación. Tras controlar los factores de confusión, finalmente se obtuvieron 99 metabolitos (ya sea para pronóstico o discriminatorios de HAP), de los cuales 16 metabolitos distinguían entre pacientes sanos y con HAP y podían usarse como valor pronóstico. (34)

La hipertensión arterial pulmonar está asociada a la aparición de una enfermedad cardiovascular y una posible muerte, por ello es muy importante también conocer los metabolitos que distinguen a los sobrevivientes de los no sobrevivientes. En este caso se encontraron 27 metabolitos que distinguen ambos grupos, incluidos aminoácidos y nucleósidos modificados. (34)

La angiogenina es una proteína que actúa como potente estimulador en la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso denominado angiogénesis. (35) Al medir los niveles de esta en plasma, se mostraron elevados en aquellos pacientes con HAP. La angiogenina también participa en la escisión inicial de los ARNt, siendo este otro motivo más por el que se ve modificada la traducción de proteínas responsables de HAP. (34)

A pesar de lo poco usual que es el uso del análisis metabolómico en hipertensión arterial pulmonar, es una herramienta muy útil para el diagnóstico y para el conocimiento del pronóstico. Sin duda la aplicación más importante en este caso es la monitorización de la respuesta a tratamientos de HAP para poder estudiar mejoras terapéuticas sobre todo enfocadas al metabolismo energético y a la regulación transcripcional. (34)

5. Conclusiones

El análisis metabolómico es sin duda una de las claves más novedosas e importantes para la obtención de un buen diagnóstico y un eficaz tratamiento. Al ser una disciplina tan actual en comparación con otras de su campo, es lógico que haya desconocimiento por parte de actuales y futuros científicos, sin embargo, las dudas se esclarecen cada vez más gracias a la gran labor que están desarrollando los expertos de la materia.

A lo largo de la etapa académica se aprenden muchos conceptos y algunos de ellos son difíciles de aplicar a la parte práctica, como es el caso de la resonancia magnética nuclear y de la espectrometría de masas. Ambas técnicas son muy influyentes en la determinación de un diagnóstico clínico a partir de análisis metabolómico y queda perfectamente reflejado en el número y la calidad de los estudios descritos relacionados con las enfermedades respiratorias en este caso.

Las enfermedades respiratorias descritas han sido asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón e hipertensión arterial pulmonar (HAP). Todas ellas limitan la vida del paciente y es por ello imprescindible un adecuado diagnóstico y en la medida de lo posible, que sea precoz. La obtención de dicho diagnóstico clínico en las patologías respiratorias mencionadas ha sido posible gracias al hallazgo de metabolitos y vías metabólicas alteradas utilizando la metabolómica como disciplina fundamental, y en muchos casos complementaria.

6. Bibliografía

1. Priego Capote F. La preparación de la muestra en metabolómica: aspectos clave para la estandarización de métodos analíticos. Boletín graseqa [Internet]. 2012;2:10–21. Available from: https://seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_2_2012.pdf
2. Beltrán Carbó A, Yanes Torrado Ó. Metabolómica: nuevo paradigma para el estudio de sistemas biológicos. Boletín graseqa [Internet]. 2012;2:5–9. Available from: https://seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_2_2012.pdf
3. Carrasco Pancorbo A, Gómez Romero M. Técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y CE-MS) en el ámbito de la Metabolómica. Boletín graseqa [Internet]. 2012;(2):22–35. Available from: https://seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_2_2012.pdf
4. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Vol. 29, Xenobiotica. Taylor and Francis Ltd; 1999. p. 1181–9.
5. Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol. 2000;18(11):1157–61.
6. Izquierdo-García JL, Nin N, Cardinal-Fernandez P, Ruiz-Cabello J, Lorente JÁ. Metabolomic profile of acute respiratory distress syndrome of different etiologies. Intensive Care Med [Internet]. 2019 [cited 2020 May 20];45:1318–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05634-w>
7. Ilhan ZE, Łaniewski P, Thomas N, Roe DJ, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling. EBioMedicine [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 May 20];44:675–90. Available from: <https://www.news-medical.net/news/20190515/7308/Spanish.aspx>
8. Mencias J. Resonancia Magnética Nuclear [Internet]. Mencias J, editor. 16 febrero 2019; 2019. 39 p. Available from: https://books.google.es/books?id=3FWIDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
9. Paniagua JC. Espectro simulado de RMN de protón del cianoeteno a 60 MHz. [Internet]. 2011. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Espectro-simulado-de-RMN-de-proton-del-cianoeteno-a-60-MHz_fig1_234126951
10. Ródenas de la Rocha S, Martín Gómez C, Sánchez-Paniagua López M. Manual de química analítica II. 3rd ed. CERSA, editor. Las Rozas (Madrid): Septiembre 2014; 2014. 214 p.
11. Cervantes A. Espectro de masas [Internet]. 2018. Available from: <https://www.quimicaorganica.org/foro/124-preguntas-sobre-ir-rmn-uv-y-masas/10171-ayuda-con-un-espectro-de-masas.html>
12. Gomis Yagües V. TEMA 3. CROMATOGRAFÍA DE GASES. [Internet]. 2008. p. 20.

- Available from: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>
13. Ozores Belmonte MI. Cromatografía de líquidos HPLC [Internet]. Available from: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc>
 14. Chopin doroteo M. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. medigraphic [Internet]. 2012;1(2):86–9. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2012/ir122g.pdf>
 15. Garcia A, De Sanctis J, Garmendia J. Revisión de biomarcadores en asma y EPOC. Neumol Cir Torax [Internet]. 2013;72:8. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Juan_De_Sanctis/publication/259358573_Revisio_n_de_biomarcadores_en_asma_y_EPOC/links/0046352b2fabbf032c000000/Revisio_n-de-biomarcadores-en-asma-y-EPOC.pdf
 16. Álvarez Rodríguez C, Armengot Carceller M, García G, Gómez-Outes A, Gómez Ruiz F, Hidalgo Requena A, et al. GEMA 4.4. Guía española para el manejo del asma. GEMA 44 Guía española para el manejo del asma [Internet]. 2019;185. Available from: https://www.semng.es/images/documentos/GEMA_4_4.pdf
 17. Wanxing Eugene H, Yong-Jiang X, Fengguo X, Chang C, Hong Yong P, Choon Nam O. Metabolomics Reveals Altered Metabolic Pathways in Experimental Asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(2):204–11.
 18. LEBi. BALB/c [Internet]. 2019. Available from: <http://www.lebi.ucr.ac.cr/biomodelos/ratones/balbc>
 19. Dunn NA, Neff LA, Maurer DM. A stepwise approach to pediatric asthma [Internet]. Vol. 66, Journal of Family Practice. Dowden Health Media, Inc; 2017 [cited 2020 May 20]. p. 280–6. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000990.htm>
 20. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Héberger K, Giordano G. Metabolomics Applied to Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:986–90.
 21. Madrid Q. ¿Qué es la EPOC? [Internet]. [cited 2020 Jun 3]. Available from: <https://www.quironsalud.es/hospital-madrid/es/carera-servicios/neumologia/escuela-pacientes/que-es-la-epoc>
 22. Jimenez-Ruiz CA, Signes Costa J, Riesco Miranda JA, Solano Reina SF. Treatment of Smoking in Smokers With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Arch Bronconeumol. 2013;49(8):354–63.
 23. Pinto-Plata V, Casanova C, Divo M, Tesfaigzi Y, Calhoun V, Sui J, et al. Plasma metabolomics and clinical predictors of survival differences in COPD patients. Respir Res [Internet]. 2019;20:219. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s12931-019-1167-y.pdf>
 24. Rodríguez Aguilar M, Godoy-Lozano E, Ramírez-García AS, Van Brussel E, Gómez-Gómez A, Flores Ramírez R. Identificación de biomarcadores metabólicos para el diagnóstico temprano de EPOC. 2016;1:7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/311206438_IDENTIFICACION_DE_BIOM

ARCADORES_METABOLOMICOS_PARA_EL_DIAGNOSTICO_TEMPRANO_DE_EPOC

25. CDC. ¿Qué es el cáncer de pulmón? [Internet]. 2019 [cited 2020 May 21]. Available from: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/lung/basic_info/what-is-lung-cancer.htm
26. NIH. Definición de metástasis - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2020 May 21]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metastasis>
27. Yu L, Li K, Zhang X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*. 2017;8:115774–86.
28. Vázquez Gandullo E, Callejón Leblic B, González Fernandez M, Grávalos Guzmán J, García Barrera T. Perfiles metabolómicos de sujetos sanos y con cáncer de pulmón. Influencia de la carga tabáquica. *Rev Española Patol Torácica*. 2016;28(1):38–46.
29. Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Humpfer E, Spraul M, et al. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by ¹H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J Proteome Res*. 2010 Jan 4;9(1):319–32.
30. Chen W, Zu Y, Huang Q, Chen F, Wang G, Lan W, et al. Study on metabonomic characteristics of human lung cancer using high resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Magn Reson Med*. 2011 Dec;66(6):1531–40.
31. Rezola A, Pey J, Rubio Á, Planes FJ. In-Silico Prediction of Key Metabolic Differences between Two Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes. Singh PK, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2020 May 21];9(8):8. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103998>
32. B. MZ, V. ML. HIPERTENSIÓN PULMONAR: IMPORTANCIA DE UN DIAGNÓSTICO PRECOZ Y TRATAMIENTO ESPECÍFICO. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2015 May 1;26(3):344–56.
33. Barberà JA, Blanco I, Callejas Rubio JL, Escribano Subías P. Protocolos. Nuevos retos en hipertensión pulmonar. *Soc Española Med Interna* [Internet]. 2019;144. Available from: <https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/protocolo-hipertension-pulmonar-2019.pdf>
34. Rhodes CJ, Ghataorhe P, Wharton J, Rue-Albrecht KC, Hadinnapola C, Geoffrey Watson Bc, et al. Plasma Metabolomics Implicates Modified Transfer RNAs and Altered Bioenergetics in the Outcomes of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2017;135:460–75.
35. Rascher-Eggstein G, Liebner S, Wolburg H. The Blood–Brain Barrier in the Human Glioma. 2007 Jan 1 [cited 2020 May 21];561–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126390117500310#!>