

# Metabolómica: la ciencia ómica más multidisciplinaria

Oscar Yanes

*La metabolómica está llamada a complementar la información bioquímica obtenida de los genes y las proteínas, facilitando las reconstrucciones genómicas actuales del metabolismo y mejorando nuestra comprensión de la biología celular y fisiología de diferentes sistemas biológicos.*

A pesar del gran interés compartido por muchas ramas de la biología y la biotecnología por esta nueva ciencia ómica, hay que admitir que la metabolómica no ha evolucionado tan rápido como la genómica y la proteómica. Esto se debe a varios aspectos del flujo de trabajo *metabólico*, los cuales vienen determinados por las características físico-químicas de las pequeñas moléculas orgánicas. A diferencia de los genes, los RNA mensajeros y las proteínas, todos ellos biopolímeros que codifican información a partir de una secuencia de monómeros (o residuos) bien conocidos —a saber, nucleótidos y aminoácidos—, los metabolitos son entidades químicas que no provienen de una transferencia de información entre residuos dentro de la célula.

El gran éxito en la caracterización de genes, RNAm y proteínas es consecuencia directa de las tecnologías y las herramientas bioinformáticas capaces de amplificar y posteriormente caracterizar, respectivamente, la secuencia de nucleótidos y aminoácidos en estos biopolímeros.

La *metabolómica*, en cambio, tiene como objetivo detectar, cuantificar y elucidar la estructura de los metabolitos, los cua-

les se caracterizan por una gran diversidad físico-química en sus estructuras moleculares. En esta gran diversidad de estructuras químicas encontramos metabolitos *endógenos* y *exógenos*; los primeros (entre los que se incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, azúcares, vitaminas, cofactores, pigmentos, antibióticos, etc.) son producidos de manera natural por un organismo, y los

**«En metabolómica hay que usar múltiples plataformas y configuraciones analíticas que maximicen la cobertura del metaboloma analizado; eso no ocurre en experimentos de genómica y proteómica.»**

segundos (tales como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas y otros xenobióticos) provienen de la interacción con el exterior. La gran diversidad de moléculas se refleja en una amplia gama de polaridades, pesos moleculares, grupos funcionales, estabilidad y reactividad química, entre otras propiedades importantes. Esto nos lleva irremediablemente a tener que utilizar múltiples plataformas y configuraciones

analíticas que maximicen la cobertura del metaboloma analizado, lo cual es algo que no ocurre en experimentos de genómica y proteómica.

Las dos plataformas tecnológicas más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos son: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), esta última casi siempre

acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS), o en menor medida la electroforesis capilar (CE-MS) (tabla 1). Como consecuencia de la gran diversidad de plataformas analíticas utilizadas y la compleja naturaleza química de los metabolitos, la identificación de la estructura de estos se ha convertido en uno de los principales cuellos de botella para convertir los datos

Tabla 1. Plataformas tecnológicas más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos: ventajas y limitaciones

Plataforma	Ventajas	Limitaciones
GC-MS	Alta reproducibilidad y sensibilidad analítica Facilidad en la identificación de metabolitos	Solo aplicable a compuestos volátiles y térmicamente estables
LC-MS	Ofrece muchas variantes cromatográficas (por ej., RP-C18, HILIC, etc.) Gran cobertura de metabolitos detectados Alta sensibilidad	Importantes requerimientos bioinformáticos para el procesamiento de datos La identificación de metabolitos no es directa
CE-MS	Consume muy poca cantidad de muestra	Solo aplicable a compuestos polares cargados Limitada robustez y reproducibilidad analítica
RMN	Altamente cuantitativa y reproducible Mínima preparación de la muestra	Poca sensibilidad
MALDI	Permite estudiar la localización de compuestos en tejidos biológicos con resolución de hasta 10 µm Análisis muy rápidos	Poco cuantitativa y reproducible

MS: espectrometría de masas; GC-MS: cromatografía de gases asociada a MS; LC-MS: cromatografía líquida asociada a MS; CE-MS: electroforesis capilar asociada a MS; RMN: resonancia magnética nuclear; MALDI (por sus siglas en inglés, *matrix-assisted laser desorption/ionization*): matriz orgánica para ionizar analitos mediante irradiación por láser.

crudos de RMN y MS en conocimiento bioquímico. Sin duda, ésta es la principal causa de que la metabolómica no haya evolucionado tan rápidamente como la genómica y la proteómica.

Aunque la identificación de metabolitos y proteínas se basa en la misma técnica de espectrometría de masas en tándem (o MS/MS), la diferencia principal radica en el hecho de que los espectros de fragmentación de los metabolitos permanecen impredecibles en gran medida, a diferencia de los datos de MS/MS para péptidos y proteínas. A pesar de los esfuerzos recientes para predecir heurísticamente los patrones de fragmentación *in silico*<sup>1,2</sup> en la práctica diaria las identificaciones de metabolitos se llevan a cabo comparando la similitud de los valores espectrales experimentales con los de un estándar puro, normalmente disponible en bases de datos o adquirido por el propio laboratorio. Las bases de datos o bibliotecas espectrales públicas y comerciales (tabla 2), por lo tanto, son herramientas indispensables para convertir los datos crudos en identidades de metabolitos, y por ende en conocimiento bioquímico. Por desgracia, tan solo un 5-10 % de los metabolitos descritos en el metabolismo y anotados en bases de datos tienen información espectral, lo que sin duda está dificultando el uso generalizado de la metabolómica. La razón principal de este bajo porcentaje es el número relativamente pequeño de metabolitos disponibles comercialmente en forma de estándares puros, por no mencionar la gran cantidad

de metabolitos con estructuras químicas desconocidas que aún no se han identificado. Por lo tanto, el desarrollo de bases de datos espectrales es esencial si queremos que la metabolómica alcance el estado de madurez de las otras ciencias ómicas.

Por lo expuesto hasta aquí y en el resto del artículo, nos encontramos con una situación de complejidad química, analítica y computacional que hacen de la metabo-

lómica posiblemente la ciencia más multidisciplinar de todas las ciencias ómicas. Hoy en día es necesario integrar el conocimiento de diversas disciplinas científicas, entre las que se incluyen la ingeniería electrónica para el procesamiento de señales espectrales, química analítica y orgánica para la detección y caracterización de metabolitos, bioestadística y física estadística para el análisis de datos, y obviamente bioquímica para la interpretación biológica de estos (fig. 1).

Tabla 2. Principales bases de datos o bibliotecas espectrales públicas

Base de datos pública	Descripción
HMDB	<a href="http://www.hmdb.ca/">www.hmdb.ca/</a> Espectros de LC-MS, GC-MS y RMN de > 10 000 compuestos
METLIN	<a href="https://metlin.scripps.edu/">https://metlin.scripps.edu/</a> Espectros de LC-MS de > 13 000 compuestos
LipidBlast	<a href="http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast">http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast</a> Espectros de masas de > 25 clases de lípidos predecidos <i>in silico</i>
LipidMaps	<a href="http://www.lipidmaps.org/">www.lipidmaps.org/</a> Contiene > 40 000 estructuras lipídicas únicas
mzCloud	<a href="https://www.mzcloud.org/">https://www.mzcloud.org/</a> Espectros de LC-MS en MS <sup>n</sup> muy bien anotados de ~3000 compuestos
MassBank	<a href="http://www.massbank.jp/">www.massbank.jp/</a> Espectros de LC-MS y GC-MS de ~3000 compuestos
GMD	<a href="http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/">http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/</a> Espectros de GC-MS de > 1400 compuestos
GNPS	<a href="http://gnps.ucsd.edu/">http://gnps.ucsd.edu/</a> Espectros de LC-MS de > 3000 compuestos

## ► Diseño de un experimento de metabolómica

El primer paso para llevar a cabo un experimento de metabolómica es determinar el número de metabolitos que se quiere medir. En algunos casos puede ser de interés examinar un conjunto definido de metabolitos mediante un enfoque dirigido. En otros casos, un enfoque abierto o no dirigido puede ser más idóneo, ya que tiene como objetivo medir y comparar entre muestras tantos metabolitos como sea posible. En última instancia, el número y las propiedades químicas de los metabolitos estudiados son atributos de cualquier experimento metabolómico que determinan el diseño experimental, condicionando la elección de la preparación de la muestra y la configuración instrumental.<sup>3</sup>

### Metabolómica dirigida

Este enfoque de la metabolómica mide una lista específica de metabolitos, típicamente de una o más vías metabólicas relacionadas sospechosas de ser de interés. Esta aproximación selectiva está normalmente condicionada por una pregunta bioquímica concreta, o hipótesis, que motiva la investigación de una vía particular y unos metabolitos. Este enfoque puede ser eficaz para estudios farmacocinéticos, así como para la medición del efecto metabólico de modificaciones genéticas en un enzima determinado.

Los avances en MS y RMN ofrecen ventajas para la realización de estudios de metabolómica dirigida, sin embargo, hay muchas más herramientas analíticas para la determinación de metabolitos que podrían en principio ser consideradas. Aunque el concepto «metabolómica dirigida» ha sido acuñado solo recientemente, históricamente existe una gran cantidad de literatura en la que se describen protocolos optimizados para la preparación y el análisis de clases específicas de metabolitos en múltiples matrices biológicas. Las principales ventajas para la realización de estudios de metabolómica dirigida son su especificidad, reproducibilidad cuantitativa, alta sensibilidad (límites de detección y cuantificación muy bajos) y alto rendimiento.

### Metabolómica no dirigida

Este enfoque es de amplio alcance y tiene como objetivo medir simultáneamente la mayor cantidad de metabolitos como sea

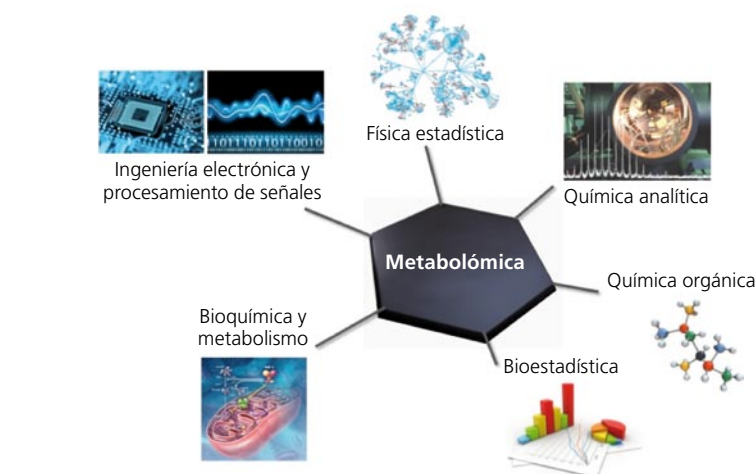


Figura 1. Disciplinas científicas utilizadas en metabolómica

posible sin necesidad de tener una hipótesis preestablecida. Así pues, hablar de metabolómica no dirigida no quiere decir hablar de un experimento sin planificar.

Cuanta más información tengamos de los metadatos, resultados previos disponibles y contexto bioquímico del problema a resolver, más fácil será diseñar un buen

## Imágenes moleculares de metabolitos sobre tejidos

Uno de los primeros pasos en el flujo de trabajo metabolómico sobre tejidos biológicos es la homogenización del tejido y el aislamiento de los metabolitos. Las técnicas estándares de metabolómica basadas en LC/MS y GC/MS no permiten obtener información de alta resolución sobre la localización espacial de los metabolitos. Por lo tanto, la correlación de un metabolito cuya concentración se ha visto alterada, con una región específica de tejido o tipo celular puede suponer un gran reto.

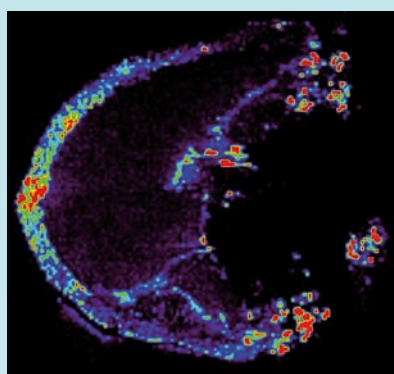
Las tecnologías de imagen basadas en RMN se han aplicado para localizar espacialmente metabolitos a

partir de muestras intactas, pero estos métodos están limitados por la poca especificidad y la sensibilidad química de la RMN. Por contra, los enfoques basados en espectrometría de masas MALDI –que utilizan una matriz

orgánica para ionizar analitos mediante irradiación por láser– ofrecen una mejor especificidad y sensibilidad química. El problema es que la técnica de MALDI-MS está limitada por la interferencia de la matriz orgánica en

la región de bajo peso molecular característica de los metabolitos. Como alternativa, se están desarrollando técnicas que sustituyen la matriz por superficies nanoestructuradas<sup>4</sup> o nanopartículas de diferentes metales<sup>5</sup> para el análisis de metabolitos con alta sensibilidad y resolución espacial (fig. 2). Estos tipos de aplicaciones de imagen por MS junto con las imágenes histológicas, per-

mitirán obtener patrones de localización de metabolitos que se correlacionen con la evolución de la patología y permitan una mejor comprensión de la fisiología química del tejido.



Distribución de un metabolito en un corte histológico de ojo de ratón mediante tecnología NIMS (Nanostructure Initiator Mass Spectrometry)

Tabla 3. Técnicas de ionización y analizadores de masas: ventajas y limitaciones

FUENTE DE IONIZACIÓN	Ventajas	Limitaciones
<b>Ionización por electrospray</b> (ESI, por sus siglas en inglés)	Alta cobertura de compuestos ionizables Proceso suave que no rompe las estructuras químicas Acoplable a cromatografía líquida	Redundancia de iones debido a la formación de múltiples aductos
<b>Ionización por electrones</b> (EI, por sus siglas en inglés)	Muy reproducible	Muy energético con alta fragmentación de estructuras químicas Solo para ionización en fase gas de compuestos volátiles y estables térmicamente
<b>Ionización química</b> (CI y APCI, por sus siglas en inglés)	Proceso relativamente suave que produce poca fragmentación de los compuestos Acoplable a cromatografía de gases y líquida	Solo determinados compuestos son ionizables
<b>Ionización por láser asistida por matriz</b> (MALDI, por sus siglas en inglés)	Proceso suave con mínima fragmentación Ionización sobre superficies sólidas únicamente	
ANALIZADOR DE MASAS	Ventajas	Limitaciones
<b>Tiempo de vuelo</b> (TOF, en inglés)	Rango de masas muy alto Rango dinámico alto Sensibilidad alta	Resolución de masa media Exactitud de masa media
<b>Cuadrupolo</b> (Q)	Rango dinámico muy alto Sensibilidad muy alta	Resolución de masa baja Exactitud de masa baja Rango de masas bajo
<b>Cuadrupolo-TOF</b> (qTOF)	Rango de masas muy alto Rango dinámico alto Sensibilidad alta	Resolución de masa media Exactitud de masa media
<b>Triple cuadrupolo</b> (QqQ)	Rango dinámico muy alto Sensibilidad muy alta	Resolución de masa baja Exactitud de masa baja Rango de masas bajo
<b>Trampa iónica</b>	Sensibilidad media Resolución de masa media Bajo coste económico	Exactitud de masa baja Rango de masas bajo Rango dinámico bajo
<b>Orbitrap</b>	Resolución de masa alta Exactitud de masa alta Rango de masas alto	Rango dinámico medio Sensibilidad media
<b>Fourier transform ion cyclotron resonance</b> (FT-ICR)	Resolución de masa muy alta Exactitud de masa muy alta Rango de masas medio	Rango dinámico medio Sensibilidad media Costoso económicamente

experimento de metabolómica utilizando la plataforma analítica más indicada, lo cual es particularmente importante en el caso de MS dada la diversidad de técnicas de ionización y analizadores de masas disponibles (tabla 3).

Los datos de la metabolómica no dirigida son sumamente complejos con tamaños de archivo del orden de gigabytes por muestra con equipos de MS de alta resolución. Estos archivos contienen miles de «picos» espectrales que presentan obstáculos importantes para su interpretación. Es aquí donde el desarrollo de herramientas computacionales y enfoques químio-

métricos desempeñan un papel clave en el análisis de los datos hoy en día. #

#### Óscar Yanes

PROFESOR ASOCIADO AL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA DE LA UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (URV), TARRAGONA  
INVESTIGADOR DEL CENTRE FOR OMIC SCIENCES DE LA URV  
COORDINADOR DE LA PLATAFORMA DE METABOLÓMICA DEL CIBERDEM

#### ► Bibliografía

- Gerlich M., Neumann S.: MetFusion: integration of compound identification strategies. *J Mass Spectrom* 2013; 48 (3): 291-8.
- Allen F., Pon A. et al.: CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic Acids Res* 2014; 42 (Web Server issue): W94-99.
- Patti G.J., Yanes O. et al.: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13 (4): 263-9.
- Northen T.R., Yanes O. et al.: Clathrate nanostructures for mass spectrometry. *Nature* 2007; 449 (7165): 1033-6.
- Calavia R., Annanouch F.E. et al.: Nanostructure Initiator Mass Spectrometry for tissue imaging in metabolomics: future prospects and perspectives. *J Proteomics* 2012; 75 (16): 5061-8.