

La presente tesis doctoral titulada “*NMR-based metabolomics for the identification of biomarkers of disease*” se centra en explorar y mostrar el potencial de la metabolómica mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) como herramienta para la detección de nuevos biomarcadores de enfermedad que permitan un diagnóstico temprano y no invasivo, así como un seguimiento del paciente. La metabolómica mediante espectroscopía de RMN se aplica específicamente en esta tesis al estudio de cuatro enfermedades: demencia tipo Alzheimer, glaucoma, aterosclerosis y vulnerabilidad de placa, y fibrosis pulmonar desarrollada tras neumonía por COVID-19.

En la introducción se presenta una descripción del proceso de análisis metabolómico para la identificación de biomarcadores de enfermedad, así como de las principales plataformas empleadas en metabolómica. Posteriormente se profundiza en el proceso seguido para análisis metabolómico mediante espectroscopía de RMN, así como en las principales herramientas estadísticas utilizadas en esta tesis. Finalmente, se describen las principales características fisiopatológicas de las enfermedades estudiadas en esta tesis, así como las formas de diagnóstico actuales y la necesidad de identificar nuevos marcadores de enfermedad.

A continuación, se describe el objetivo principal de esta tesis, así como los objetivos específicos que se abordan en los capítulos experimentales.

En el primer capítulo, se identifican biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer disease*, AD) y del progreso de pacientes con deterioro cognitivo leve (*mild cognitive impairment*, MCI) a enfermedad de Alzheimer mediante metabolómica de RMN en muestras de suero. Para ello, en primer lugar, se producen modelos de estadística multivariante de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (*Partial least squares-discriminant analysis*, PLS-DA) para la discriminación entre pacientes de AD y MCI y controles con cognición normal (*healthy controls*, HC). Los modelos de clasificación obtenidos para discriminar AD frente a MCI y HC mostraron excelentes parámetros de clasificación. Sin embargo, la discriminación entre MCI y HC no alcanzó significación, poniendo de manifiesto cómo el desarrollo de AD altera el metabolismo celular. Posteriormente, para la identificación de biomarcadores del proceso de evolución de MCI a AD, el grupo MCI se subdividió atendiendo a, si en un periodo de 1 a 3 años tras la adquisición de la muestra, su estado cognitivo había deteriorado a AD. Se observó que la lisina, el piruvato, la colina, la fenilalanina y las lipoproteínas, tenían unos valores de concentración relativa en suero diferente dependiendo si el paciente evolucionaba a AD o se mantenía estable. Además, se observaron diferencias en las rutas metabólicas entre estos grupos de pacientes.

En el segundo capítulo de la tesis, se estudiaron las diferencias metabólicas entre pacientes MCI y control de un grupo de pacientes diferente, por medio del análisis de los metabolitos presentes en muestras de plasma con espectroscopía de RMN, así como la presencia de marcadores de peroxidación lipídica, que fueron analizados por medio de espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (UPLC-MS/MS). El proceso de oxidación celular se ha visto estrechamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y, de hecho, en el trabajo presentado se observa como la adición de marcadores de peroxidación lipídica al conjunto de datos de metabolómica de RMN para su estudio mediante estadística multivariante mejora los modelos de clasificación para la identificación de biomarcadores de MCI. En este trabajo se realizaron modelos de clasificación PLS-DA utilizando los metabolitos identificados mediante espectroscopía de RMN, los marcadores de peroxidación lipídica detectados con UPLC-MS/MS, y la combinación de ambos, obteniéndose el resultado con una mayor significación estadística cuando se combinan ambas técnicas. Los metabolitos identificados como potenciales biomarcadores de MCI en plasma son isoleucina, valina, 3-hidroxi-butarato, 2-hidroxi-3-metilvalerato, glutamato, glutatión, cisteína, malonato, n-nitroso dimetilamina, taurina, prolina e isoprostanos. Especialmente, por su relación con la patología, se destacan como potenciales biomarcadores la isoleucina, la valina, el glutamato, la taurina, la prolina, la cisteína y los isoprostanos.

En el tercer capítulo de la tesis, se analizaron lágrimas de pacientes de glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) y controles por medio de espectroscopía de RMN, para la identificación de biomarcadores de la patología en un medio mínimamente invasivo, como son las lágrimas. Los modelos de clasificación obtenidos permitieron clasificar las muestras de POAG y controles con altos valores de sensibilidad y especificidad. Del análisis de los metabolitos participantes en el modelo de clasificación se determinaron como potenciales biomarcadores de POAG en lágrima la taurina, glicina, urea, glucosa, ácidos grasos insaturados, fenilalanina, fenilacetato, leucina, compuestos n-acetilados, el ácido fórmico y la uridina. De especial relevancia son la fenilalanina, glucosa, leucina, glicina y taurina por su relación con la patología.

A continuación, en el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos del análisis metabólico mediante espectroscopía de RMN de muestras de placas de ateroma y suero de pacientes con estenosis de carótida. Se obtuvieron muestras de pacientes sintomáticos (que habían presentado algún signo de accidente cerebrovascular) y asintomáticos, a fin de determinar biomarcadores de vulnerabilidad de placa. De los análisis realizados en placa, por

medio de espectroscopía de ángulo mágico de alta resolución (*high resolution magic angle spinning*, HRMAS), se determinaron como potenciales biomarcadores de vulnerabilidad el mio-inositol, glutamato, y ácidos grasos insaturados, teniendo especial relevancia el glutamato por su relación con la patología. La determinación de biomarcadores en suero resultaba más interesante a nivel clínico, y del análisis estadístico realizado se obtuvieron como potenciales marcadores de vulnerabilidad de placa la treonina, la histamina y los ácidos grasos insaturados. En el quinto y último capítulo experimental se analizaron por medio de espectroscopía de RMN muestras de suero de pacientes que habían estado ingresados en el hospital por neumonía causada por el virus SARS-CoV-2, a fin de identificar biomarcadores para predecir el desarrollo de fibrosis pulmonar, una de las secuelas más graves desarrolladas tras la COVID-19. Los modelos de clasificación PLS-DA generados fueron capaces de discriminar que pacientes habrían desarrollado fibrosis pulmonar un año después del alta hospitalaria (y la toma de muestras) con altos valores de sensibilidad y especificidad. Los metabolitos propuestos como potenciales biomarcadores de desarrollo de fibrosis, por su participación en el modelo y la presencia de diferencias significativas en su concentración relativa entre ambos grupos son la glucosa, valina y ácidos grasos.

Finalmente, se presenta la discusión general y las principales conclusiones generales de la tesis, así como las conclusiones derivadas del trabajo experimental aquí presentado. Esperamos que estos resultados abran la puerta al uso de la metabolómica mediante espectroscopía de RMN para la identificación de biomarcadores tempranos y no invasivos, y de este modo resolver una de las principales necesidades de la medicina actual.