

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Comparativa de perfiles metabólicos asociados a la
hiperglucemia y su tratamiento en ratón.**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Edgar Enrique Cardona Ferrer

TUTORA: Dra. Martina Palomino Schätzlein

COTUTORA: Dra. María Pilar López Gresa

Curso académico 2017/2018

Valencia, septiembre de 2018

Datos personales

Nombre y apellidos: Edgar Enrique Cardona Ferrer

Datos del trabajo fin de grado

Título: Comparativa de perfiles metabólicos asociados a la hiperglucemia y su tratamiento en ratón.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a (académico): María Pilar López Gresa

Cotutor/a: Martina Palomino Schätzlein

Fecha de defensa: septiembre 2018

Abstract

To study changes caused by hyperglycemia, related to diabetes mellitus, and specifically, diabetic retinopathy, a comparative study of the metabolic profiles of different parts of eye mouse (*mus musculus*) using NMR is performed. The metabolic profiles associated with wild type mice and knock -out mice to *Irs2* gene, an insulin receptor, were compared. It has been found that there are significant variations of metabolites between different parts of the eye as well as between the different strains, in addition to offer an approach to the different steps in a study of this kind.

Keywords

Metabolomics, NMR, *mus musculus*, *Irs2*, hyperglycemia, diabetes mellitus

Resumen

Para el estudio de las alteraciones producidas por la hiperglucemia, relacionadas con la diabetes mellitus, y en concreto la retinopatía diabética, se realiza un estudio comparativo de los perfiles metabólicos de las diferentes partes de ojo de ratón (*mus musculus*) utilizando la técnica de RMN. Se comparan los perfiles metabólicos asociados a ratones wild type y ratones knock -out para el gen *Irs2*, un receptor de insulina usando técnicas metabolómicas. Se comprueba que existen metabolitos con variaciones significativas entre las diferentes partes del ojo así como entre las diferentes cepas, además de ofrecerse una aproximación a los diferentes pasos a seguir en un estudio de este tipo.

Palabras clave

Metabolómica, RMN, *mus musculus*, *Irs2*, hiperglucemia, diabetes mellitus

Agradecimientos

En este apartado, aunque sea brevemente, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que me han ayudado en el periplo de mi educación universitaria, que ya toca a su fin.

A la Universidad Politécnica de Valencia, por haberme acogido en su seno y haberme formado, y por haber sido el lugar donde he forjado algunas de las mejores amistades de mi vida. Al Centro de Investigación Príncipe Felipe, que me ha otorgado la oportunidad de realizar mis prácticas y mi TFG en sus instalaciones, rodeado de investigadores y proyectos de gran nivel.

A mi familia, por haberme apoyado en todo momento, y a mis amistades, las cuales no listare por temor a dejarme a alguien importante, que siempre han estado ahí para un consejo, una conversación, un desahogo, un apoyo, cualquier cosa que haya necesitado.

Y, por último, aunque no por ello menos importante, sino incluso todo lo contrario, a mis tutoras, Mapi y Martina. Gracias por vuestro apoyo, guía y colaboración, manteniéndose incluso cuando es inmerecida; yendo más allá de vuestras obligaciones laborales. Gracias por ayudarme incluso en vuestras vacaciones personales; puedo afirmar sin temor a equivocarme que sin vosotras y vuestra dedicación no estaría hoy presentando este Trabajo y finalizando mis estudios.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	METABOLÓMICA	1
1.1.1.	Definición y aplicaciones generales.	1
1.1.2.	Metabolómica y modelo animal.	1
1.1.3.	Metabolómica y diabetes.	2
1.1.4.	Instrumentación utilizada en Metabolómica.	2
1.2.	Resonancia Magnética Nuclear.	3
1.2.2.	Fundamento físico.	3
1.2.3.	Entorno químico y desplazamiento químico.....	4
1.3.	Análisis de matrices de datos	4
1.3.1.	Integración de los espectros de RMN	5
1.3.2.	Análisis estadístico univariante.....	5
1.3.3.	Análisis estadístico multivariante	5
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1.	Material biológico.....	7
3.2.	Extracción de metabolitos.	7
3.3.	Preparación de las muestras.	8
3.4.	Adquisición de los espectros.	8
3.5.	Procesado de los espectros	8
3.5.1.	Preprocesado.....	8
3.5.2.	Asignación de picos	9
3.5.3.	Integración	10
3.5.4.	Análisis estadístico.....	10
3.5.5.	Interpretación biológica	10
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1.	Asignación de metabolitos.	11
4.2.	Análisis estadístico multivariante.	13
4.2.1.	Comparativa de las partes del ojo y el ojo completo	13
4.2.2.	Humor vítreo	15
4.2.3.	Retina	16
4.2.4.	Pigmento	17
4.3.	Análisis estadístico univariante de metabolitos con variaciones significativas.....	18
4.3.1.	Fase acuosa	18

4.3.2 Fase orgánica.....	21
4.4 Interpretación biológica	24
4.5 Estudio de afectación de rutas metabólicas	26
5 CONCLUSIONES	28
6 BIBLIOGRAFÍA.....	29
6.1 Bibliografía de Consulta.....	30

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de un equipo de RMN	4
Figura 2: Representación esquemática de la estructura del ojo. En rojo señalada la parte que se toma como Pigmento.....	7
Figura 3: Pasos de preprocesado. a) Corrección de línea base. b) Corrección de fase. c) Referenciado	9
Figura 6: Score plot obtenido del PCA del ojo completo y sus partes.	13
Figura 7: Loading plot de la comparativa entre el ojo completo y sus partes.	14
Figura 8: Score plot de humor vítreo WT y KO	15
Figura 9: Loading plot de humor vítreo WT y KO.....	15
Figura 10: Score plot retina WT y KO.....	16
Figura 11: Loading plot de retina WT y KO.	16
Figura 12: Score plot de pigmento WT y KO.....	17
Figura 13: Loading plot de pigmento WT y KO.	17
Figura 14: Boxplots de los metabolitos con variaciones significativas de retina.	18
Figura 15: Boxplots de metabolitos con variaciones significativas de pigmento.	19
Figura 16: Boxplots de metabolitos con variaciones significativas de humor vítreo.	19
Figura 17: Bloxplots de metabolitos de retina (FO)	21
Figura 18: Boxplots de metabolitos de humor vítreo (FO)	22
Figura 19: Boxplots de metabolitos de pigmento (FO).	22
Figura 19: Clases de rutas metabólicas asociadas a los metabolitos analizados.	27
Figura 20: Rutas metabólicas relacionadas	27

Índice de tablas

Tabla 1: Modelos animales utilizados en investigación y principales aplicaciones.....	2
Tabla 2: Equipo y parámetros para la obtención de los espectros.	8
Tabla 3: Metabolitos con variaciones significativas en retina.	20
Tabla 4: Metabolitos con variaciones significativas en humor vítreo.	20
Tabla 5: Metabolitos con variaciones significativas en pigmento.	21
Tabla 6: Metabolitos en retina (FO)	23
Tabla 7: Metabolitos en pigmento (FO).....	23
Tabla 8: Metabolitos en humor vítreo (FO)	24
Tabla 9: Listado de rutas metabólicas con mayor número de metabolitos incluidos.....	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. METABOLÓMICA

1.1.1. Definición y aplicaciones generales.

Entre los años 90 y 2000, debido al impulso en la mejora y desarrollo de las técnicas de secuenciación de los ácidos nucleicos, y el aumento de capacidad computacional, apareció un nuevo conjunto de disciplinas conocidas como las técnicas ómicas. Las oportunidades que estas nuevas técnicas proporcionaron a la comunidad científica y el tipo de información obtenido generó un gran interés hacia este tipo de disciplinas “ómicas”. En la actualidad, las principales son Genómica, Metabolómica y Proteómica.

Estas disciplinas permiten la caracterización de sistemas biológicos en varios niveles de organización biomolecular (Nicholson et Al., 2004). Esta aproximación, denominada Biología de Sistemas, se basa en la integración computacional de la información genética, transcriptómica, proteómica y metabolómica con el objetivo de entender todos los mecanismos moleculares de una célula u organismo (Hood et al., 2004).

Siendo el metaboloma el conjunto de los metabolitos sintetizados por un sistema biológico (Fiehn, 2002), la metabolómica se define como el estudio a nivel global de los perfiles de metabolitos de un sistema dado bajo unas determinadas circunstancias (Rochfort, 2005). Al contrario que la Proteómica o la Genómica, la Metabolómica presenta un bajo coste por muestra y análisis con una gran reproducibilidad. (Nicholson et al., 2007)

Principalmente, la Metabolómica se usa con dos propósitos principales: la búsqueda de huellas metabólicas características en diferentes poblaciones, permitiendo la clasificación de nuevas muestras en base a dichas huellas; y la comprensión e integración de las distintas rutas metabólicas, evaluando su relación y el control de la concentración celular de los metabolitos (Fiehn, 2007).

1.1.2 Metabolómica y modelo animal.

En la investigación biomédica, el uso de cultivos celulares y de tejidos aportan una información relevante, aunque limitada debido a la falta de la interacción entre diversos tejidos característica de los organismos complejos. Por ello, el uso de organismos completos tiene una gran importancia en la investigación. Los modelos animales ofrecen en la investigación ventajas como el suministro prácticamente ilimitado y la facilidad de manipulación. Los modelos animales más habituales se listan en la Tabla 1.

En los modelos animales, la Metabolómica presenta una gran importancia en la caracterización y fenotipado de mutantes, permitiendo el análisis completo de las alteraciones producidas por una alteración genética dada, aumentando la información obtenida y evaluando

el metabolismo en su conjunto, debido a que muy a menudo alteraciones puntuales provocan cambios en cascada a lo largo de todo el metabolismo. También permite la discriminación de muestras en función de diferencias en la dieta, sexo y edad entre otros factores, lo que facilita la caracterización de alteraciones metabólicas debidas a estos factores.

Tabla 1: Modelos animales utilizados en investigación y principales aplicaciones.

Organismo modelo	Nombre común	Aplicaciones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura cervecera	Estudio de procesos biológicos y celulares
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca del vinagre	Mapas genéticos, búsqueda de mutantes, ligamiento y recombinación, identificación de genes.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Gusano	Desarrollo y envejecimiento
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Mapeo e identificación de genes asociados al desarrollo de órganos
<i>Mus musculus</i>	Ratón	Genética de enfermedades humanas

El principal organismo modelo en el estudio de enfermedades humanas es el ratón de laboratorio o *Mus musculus*, debido a la gran similitud existente en las características fisiológicas y en mecanismos patológicos, además de compartir con el ser humano casi la totalidad de sus genes.

1.1.3 Metabolómica y diabetes.

La *diabetes mellitus* tipo II representa uno de los mayores problemas de salud a nivel global, estimando la Organización Mundial de la Salud (OMS) que afectará a 366 millones de personas en el año 2030. Se trata de una enfermedad crónica caracterizada por niveles altos de glucosa en sangre, que puede ser causada por el progresivo fallo de las células b pancreáticas, o por el desarrollo de resistencia a insulina que causa la pérdida de función de las células b pancreáticas. La sintomatología asociada más común consiste en: poliuria, polidipsia y pérdida de peso sin causa aparente, entre otros.

Ante la ausencia de tratamiento, el paciente puede desarrollar retinopatía, neuropatía, nefropatía y complicaciones cardiovasculares (Bastaki, 2005). Por ello, tiene una gran importancia la detección temprana de la enfermedad.

1.1.4 Instrumentación utilizada en Metabolómica.

Las dos técnicas analíticas más utilizadas en Metabolómica son la espectrometría de masa (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Ambas técnicas se basan en las

propiedades físicas de los compuestos a analizar, por lo que no se ven influidas por factores externos y por ello son más reproducibles (Dunn et al., 2005).

La EM presenta una mayor capacidad resolutive y una mayor sensibilidad que la RMN, pero precisa de una etapa previa de separación de los componentes, como la cromatografía líquida o de gases, además de tratarse de una técnica destructiva basada en la ionización de moléculas. Su funcionamiento se basa en la ionización de moléculas, provocando su fragmentación, y en la separación de dichos fragmentos en base a su masa al ser sometidos a un campo magnético.

La RMN presenta varias ventajas respecto a la EM, como son:

- Técnica no destructiva.
- Técnica no selectiva.
- Alta reproducibilidad.
- Mínima preparación de la muestra.
- Permite identificar y resolver la estructura de compuestos.

1.2 Resonancia Magnética Nuclear.

1.2.2 Fundamento físico.

La resonancia magnética nuclear se basa en las propiedades mecanico-cuánticas de los núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones. Estos átomos tienen un momento angular y un momento magnético intrínsecos, lo que se refleja en un número de spin diferente de 0, como por ejemplo el ^1H , ^{13}C o ^{15}N .

En presencia de un campo magnético intenso, los núcleos con un spin diferente de 0, resuenan alineados con dicho campo. Al aplicar sobre estos núcleos un pulso de radiofrecuencia, se consigue que alteren su orientación dentro del campo. La absorción de energía asociada a esta variación es recogida por un receptor y amplificador de radiofrecuencias que transmite la información a un registrador. El tubo conteniendo la muestra se encuentra suspendido a la altura del receptor/emisor por medio de una corriente de aire. Para evitar la contaminación de la señal por los protones contenidos en el disolvente, se utilizan versiones deuteradas del mismo, como el agua deuterada (D_2O o $^2\text{H}_2\text{O}$) y el cloroformo deuterado (CDCl_3 o $^2\text{HCl}_3$), dependiendo de la naturaleza polar o apolar, respectivamente, de la muestra a analizar. En la Figura 1 se presenta un esquema de dicho equipo.

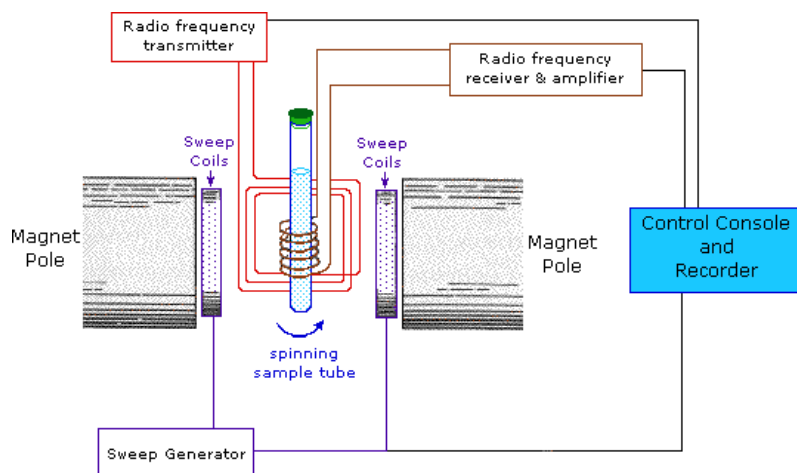


Figura 1: Esquema de un equipo de RMN

1.2.3 Entorno químico y desplazamiento químico

Dependiendo del entorno químico local, formado por el resto de átomos de la molécula, así como la concentración de sales y el pH de la solución, los diferentes núcleos de un mismo tipo de átomo, por ejemplo del hidrógeno, de una molécula resuenan a frecuencias ligeramente diferentes. Dado que este desplazamiento y la frecuencia de resonancia fundamental son directamente proporcionales a la fuerza del campo magnético, el desplazamiento de frecuencia se convierte en un valor adimensional conocido como desplazamiento químico. Este desplazamiento se registra como una medida relativa a frecuencias de resonancia utilizadas como referencia, usando como tales la señal de trimetilsilano (TMS) para la fase orgánica y el ácido trimetilsilil-propanoico (TMSP-d4) para la fase acuosa. Dividiendo esta diferencia de frecuencia entre la frecuencia de referencia del patrón se obtiene el desplazamiento químico (δ), expresado en partes por millón (ppm). Este desplazamiento químico es el utilizado para la identificación de las moléculas presentes en la muestra.

1.3 Análisis de matrices de datos

En los ensayos y experimentos con técnicas metabolómicas se obtienen grandes cantidades de datos, que impiden que puedan analizarse de manera sencilla utilizando métodos convencionales. Sirva de ejemplo el resultado reflejado en este ensayo, en el que se han obtenido de los espectros de RMN 4.788 valores que precisan de análisis estadístico, partiendo de 36 muestras diferentes.

Por ello, la Metabolómica, como el resto de disciplinas “ómicas” se basan en el tratamiento informatizado de los datos, la automatización de dicho tratamiento todo lo posible. Existen diversas herramientas informáticas disponibles para ello, incluyendo software variado que va desde software uso general como hojas de cálculo (Excel y Calc), a software matemático y estadístico como pueden ser R, SIMCA-P o SPSS.

1.3.1 Integración de los espectros de RMN

Las señales, o picos, obtenidos en los espectros de RMN presentan una relación lineal entre la concentración del metabolito y el área de la señal asociada. Por ello, es necesario realizar la integración de cada uno de los picos en cada espectro para obtener datos extrapolables a la concentración relativa de cada compuesto. Si todos los espectros a integrar comparten las mismas señales, es posible aplicar el mismo proceso a todos los espectros de manera simultánea, pudiendo obtenerse así una matriz de datos que contenga cada una de los valores asociados a las áreas de las señales de los espectros. Esto se consigue definiendo una plantilla de integración, o un listado de las áreas a integrar, que el software MestRenova (utilizado en este estudio) aplicará a una serie de espectros.

1.3.2 Análisis estadístico univariante

El análisis estadístico univariante de los datos consiste en la obtención de descriptores estadísticos asociados a diferentes valores de una sola variable que permiten evaluar la validez de los datos obtenidos, representaciones de poblaciones, etc.; así como diversas graficas que permiten una evaluación más visual de dichos datos. Destaca en este apartado el software libre R, que permite la automatización de dichos análisis y la generación de graficas de manera sencilla mediante el uso de scripts. En el Anexo I puede verse el script utilizado para la obtención de boxplots de manera automatizada en este Trabajo.

1.3.3 Análisis estadístico multivariante

Los métodos estadísticos multivariantes permiten el estudio de 3 o más variables de manera conjunta. Su utilización habitual en la Metabolómica consiste en la generación de clústeres o grupos de muestras en función de las variables, agrupando las muestras en grupos similares entre si y diferentes al resto de grupos. Un uso asociado al anterior, y muy extendido, es el análisis de componentes principales (PCA), en el cual se obtienen el valor relativo, o peso, de las variables en los vectores creados como componentes principales (PC). Este valor relativo nos permite saber a qué variables se debe la discriminación en clústeres, obteniendo así los metabolitos más significativos en la diferenciación entre las distintas poblaciones de muestras.

De manera habitual estos análisis se representan con dos tipos de gráficas, los score plot y los loading plot, siendo ambas bidimensionales de manera habitual. Los loading plot representan el peso específico de cada una de las variables sobre las PC, o como de influenciadas por esas variables se encuentran dichas PC. Los score plot son representaciones donde la posición de las muestras viene determinada en función de los valores del conjunto de sus variables sobre las PC.

Este tipo de análisis representa una herramienta muy potente que además se encuentra representada de manera muy visual, permitiendo la comparación de muestras de manera sencilla y rápida, que permite además identificar de forma rápida y fiable muestras atípicas o errores en el procedimiento experimental; obteniendo además las variables que influyen en dicha separación.

2 OBJETIVOS

Como objetivo del presente estudio se va a proceder a evaluar de manera metabólica las variaciones en los perfiles metabólicos asociados a la hiperglucemia, realizando este ensayo dentro del ámbito de estudio de la diabetes mellitus.

En el estudio metabólico de las alteraciones producidas por la diabetes mellitus, existe una gran cantidad de estudios e información asociados a procesos químicos o reacciones enzimáticas concretas cuyas alteraciones se encuentran evaluadas de manera individual.

El abordaje con técnicas metabólicas de dichos estudios permite obtener una comprensión global de los mecanismos implicados, observando alteraciones que pueden extenderse a lo largo del metabolismo.

Centrándonos en la retinopatía diabética, una complicación muy común en la diabetes mellitus y con un gran impacto en la vida diaria de las personas afectadas, el número de estudios de carácter metabólica se reduce muchísimo.

Aplicando estos estudios a los tejidos afectados de manera específica, sería posible obtener nueva información referente a esta dolencia, por lo que el estudio de los perfiles metabólicos de diferentes partes del ojo diabético podría aportar más información en el tratamiento de esta complicación asociada la diabetes.

Por ello, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- 1 Elaborar perfiles metabólicos de las diferentes partes del ojo en ratón: humor vítreo, retina y pigmento, utilizando resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y ratones knock out para IRS2.
- 2 Comparación de estos perfiles metabólicos entre sí, obteniendo información respecto diferencias existentes entre ellos.
- 3 Evaluar estas diferencias obteniendo información sobre las rutas bioquímicas afectadas

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico.

El estudio se realizó usando ojos de ratón *wild-type* y *knock-out* para IRS2 cedidos por el laboratorio del Dr. Luke Noon del CIPF, concretamente ratones B6;123-*Irs2*^{tm1Mfw}/J adquiridos en The Jackson Laboratory (USA). Para la caracterización del ojo entero, se utilizaron ratones IBalb7c cedidos por el laboratorio de la Dra. María Jesús Vicent del CIPF, adquiridos en Laboratorios Harlan (España). Para la realización de los espectros analizados se han tomado los ojos de 3 ratones sanos o *wild type*(WT) y otros 3 *knock-out* IRS2 (KO). Todos los ratones fueron sacrificados a las 8 semanas de edad, cuando el peso y la concentración de glucosa en sangre de los ratones KO fue superior a los WT.

Para el estudio de los perfiles metabólicos comparativos entre las diferentes partes del ojo de ratón, el ojo se ha sometido a una disección, separándose en 2 partes independientes a las que nos referiremos a partir de ahora como pigmento (el cual incluye parte de la córnea, el iris, la pupila y el cristalino) y la retina (que incluye parte de la córnea). El humor vítreo también fue separado en una muestra aparte. En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de dicha disección.

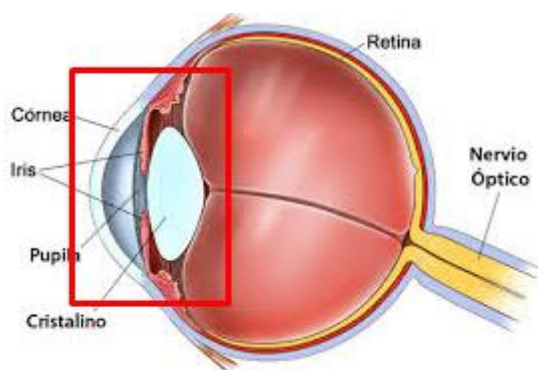


Figura 2: Representación esquemática de la estructura del ojo. En rojo señalada la parte que se toma como Pigmento

3.2 Extracción de metabolitos.

La extracción de metabolitos de las diferentes partes del ojo se realizó siguiendo el protocolo de extracción con metanol/cloroformo/agua, ya que se trata de un método rápido y sencillo que permite extraer y cuantificar metabolitos polares y apolares (Beckonert et al., 2007). El método consiste en triturar las muestras congeladas en nitrógeno líquido con un mortero. Después el triturado se transfirió a un tubo Eppendorf manteniéndose en hielo durante todo el proceso. Para la extracción se añadieron 160µL de metanol y 80 µL de cloroformo por cada una de las partes aisladas de 1 ojo. Se realizó una homogenización en un vortex y se sometieron las muestras a 3 ciclos de congelación y descongelación con nitrógeno líquido. A continuación, se añadieron 125 µL de cloroformo y 125µL de agua Milli-Q, homogeneizándose con vortex y

centrifugándose a 12.000 g durante 15 minutos. Tras la centrifugación se obtuvieron dos fases, la superior siendo la parte acuosa (metanol/agua) con los metabolitos polares y la inferior (cloroformo) con los metabolitos apolares. Se separan las fases en sendos Eppendorf, siendo la fase polar liofilizada y la fase apolar evaporada en un concentrador a vacío. Se conservan los extractos secos a -80 °C

3.3 Preparación de las muestras.

El extracto de la fase acuosa se resuspendió en 550 µL de tampón RMN (100 mM de tampón fosfato en D₂O, pH 7,4, 0,1 mM de TSP) con un vortex y se transfirió a un tubo de RMN. El extracto de la fase orgánica se resuspendió en 600 µL de cloroformo deuterado con 0,03 % v/v de TMS usando una pipeta de cristal. El extracto fue resuspendido con un vortex y transferido a un tubo de RMN sellado a continuación con Parafilm.

3.4 Adquisición de los espectros.

Usando el software Topspin 3.5 se realiza la adquisición de los espectros. En la Tabla 2 se muestran los parámetros utilizados en la obtención de los mismos.

Tabla 2: Equipo y parámetros para la obtención de los espectros.

Parámetros	Fase acuosa	Fase orgánica
Equipo	Bruker AvIII-500	Bruker AvII-600
Temperatura (°C)	27	27
Sonda	TCI de 5 mm	TBI de 5 mm
Free Induction Decays (FID)	128	256
Amplitud espectral (ppm)	30	20
Tiempo de relajación entre FIDs (s)	3	3

A la FID resultante se le aplicó una transformada de Fourier multiplicando por una función exponencial de 0,5 Hz.

3.5 Procesado de los espectros

3.5.1 Preprocesado

Partiendo de los espectros brutos obtenidos con el software Topspin, es necesaria la realización de diversos ajustes previos usando el software MestRenova para su correcta interpretación. Para empezar, se realiza una corrección de la fase del espectro, tomando como referencia ambos extremos de la zona del patrón a 0 ppm e intentando que ambos lados queden

a la misma altura. Una vez obtenido el resultado óptimo se realiza el mismo proceso a lo largo del espectro, en aquellas zonas en las que sea necesario.

Se realiza a continuación la corrección de la línea base, disminuyendo la intensidad de la señal correspondiente al ruido de fondo y evitando que existan valores negativos de línea base principalmente en las zonas que contienen señales de integración. Este paso es de gran importancia para obtener unos valores de integración que se correspondan con las abundancias relativas de los distintos metabolitos. Normalmente este es un paso que se realiza de manera automática, necesitando únicamente una revisión al acabar el proceso. En el caso de las muestras de retina, este proceso hubo de realizarse de manera manual, debido a la alta dilución de las muestras.

El siguiente paso consiste en el alineamiento del espectro respecto al patrón interno de referencia, ajustando el pico asociado a un desplazamiento (δ) de 0 ppm. El patrón utilizado se corresponde con el Trimetilsilano o TMS (para la fase orgánica) y ácido Trimetilsil-Propanoico o TSP (para la fase acuosa). En la Figura 3 se puede ver una representación de estos pasos.

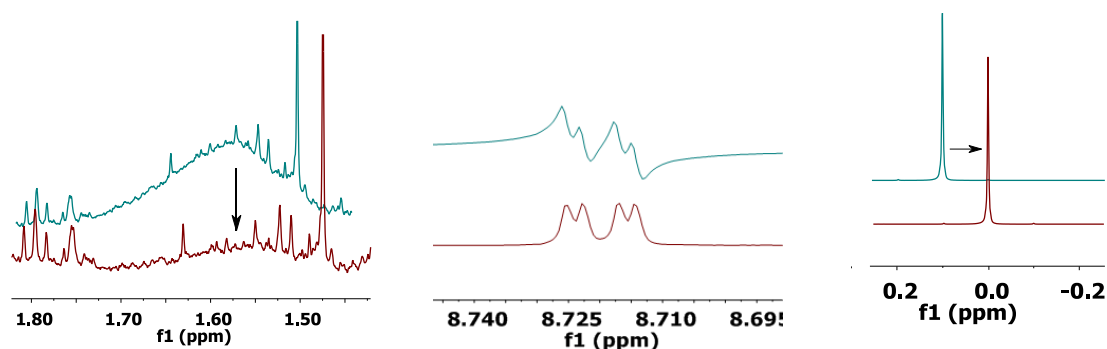


Figura 3: Pasos de preprocesado. a) Corrección de línea base. b) Corrección de fase. c) Referenciado

Por último, en cuanto al procesado previo de los espectros, es necesaria la normalización de la intensidad de los mismos para evitar el factor muestra. La normalización se realiza asignando un valor total que se aplicara sobre todo el espectro, aunque se excluyen los picos asociados al patrón y al disolvente utilizados.

3.5.2 Asignación de picos

La asignación consiste en relacionar los metabolitos presentes en la muestra con sus señales correspondientes en el espectro. Para ello se compara el espectro del extracto con los espectros de patrones puros aislados. Se realiza un cribado inicial con el software Chenomx, el cual contiene información de los espectros de 338 metabolitos en su versión gratuita. La característica más destacable de dicho software es que permite superponer las señales de los metabolitos seleccionados sobre el espectro original, facilitando así una rápida y sencilla asignación de señales, permitiendo ajustar el desplazamiento químico y la intensidad de dichas señales, mientras mantiene los cambios sobre el resto de señales. Además, presenta como función el comprobar el resultado del solapamiento de señales complejas, obteniendo una

simulación del espectro resultante que sirve en muchos casos para poder descartar o asignar una señal solapada.

Para la asignación del resto de señales se utiliza a continuación la base de datos *Human Metabolome Database* versión 3.6 (Wishar et Al., 2013) que contiene información química y espectros tanto de EM como RMN relacionados con casi 42,000 metabolitos. Esta base de datos, que permite búsqueda por nombre o por listado de señales, se usa en una primera instancia para confirmar los resultados obtenidos con Chenomx, y a continuación para identificar el resto de señales. Las señales recogidas incluyen datos como la multiplicidad, el desplazamiento químico y la intensidad relativa, además de encontrarse metabolitos tanto polares como solubles en lípidos.

3.5.3 Integración

A continuación, se realiza la selección manual de zonas de integración en los espectros, en la que se genera un listado de zonas objetivo de integración delimitando sus extremos izquierdo y derecho. Esta plantilla se va aplicando y ajustando en los diferentes espectros para obtener el listado final de zonas de integración que se aplicara a todos los espectros. La integración, al igual que la visualización y el preprocesado de los espectros, se realiza con el software MestReNova y las diversas herramientas que incluye

3.5.4 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos de integración, se realiza una normalización respecto a las integrales obtenidas, descartando los valores correspondientes al patrón y a la señal del agua. Se introducen los datos ya normalizados en el software SIMCA-P para realizar un análisis estadístico multivariante. Se efectúa un análisis de componentes principales (PCA) obteniéndose diversos score plot, que muestra la agrupación de puntos (correspondientes a muestras) en función de clases, coincidiendo dichas clases con las cepas WT y KO. Al obtener el loading plot asociado a los datos obtenemos una representación gráfica de los metabolitos con mayor participación en la diferenciación de dichas clases

Por otra parte, se obtienen los valores estadísticos de promedio, desviación estándar de la media (SEM) y p-value de la prueba t-Student; para evaluar la significancia de los metabolitos y para encontrar posibles irregularidades. Se realizan además diversos gráficos boxplot comparando KO y WT usando el software estadístico R.

3.5.5 Interpretación biológica

Por último, la interpretación biológica de los resultados obtenidos se realiza mediante la búsqueda de bibliografía asociada de los metabolitos de manera independiente y la utilización de herramientas web como PaintOmics, la cual permite buscar y representar todas las rutas metabólicas afectadas en base a unos valores de expresión.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Asignación de metabolitos.

Como resultado del análisis por RMN de una muestra representativa de las diferentes partes del ojo (retina, pigmento y humor vítreo) se obtuvieron los espectros representativos que se muestran en las Figuras 4 y 5. Como primer paso se procede a la identificación de los metabolitos que representan las diferentes señales que aparecen en los espectros obtenidos.

En la Figura 4, se pueden observar los espectros apilados de las 3 partes en las que se dividieron los ojos para su estudio independiente, humor vítreo, retina y pigmento. Este apilamiento de espectros permite observar las diferencias aparentes entre los espectros de las diferentes partes, así como listar todos los metabolitos identificados en las diferentes partes, ya que, en ocasiones, dichos metabolitos se encuentran ausentes en algunas de ellas. El anexo II contiene un listado de las zonas utilizadas para la integración.

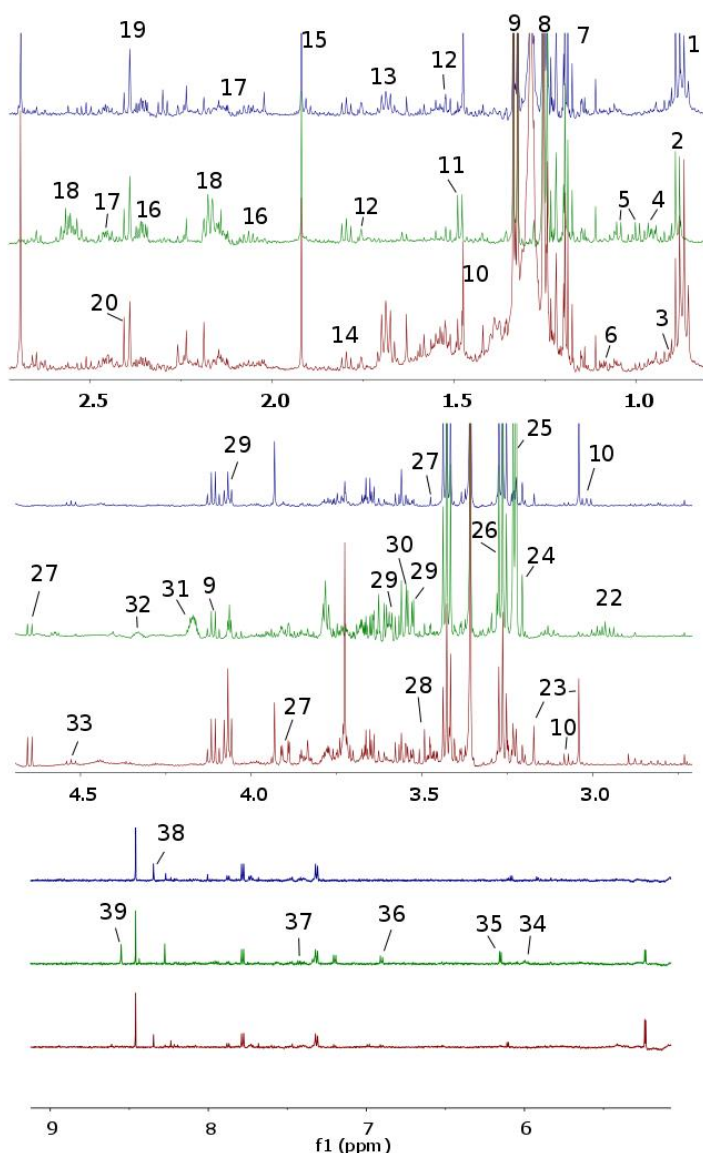


Figura 4: Asignación de señales en la fase acuosa de retina, pigmento y humor vítreo de ratón. 1. 2-Hidroxibutirato, 2. Valerato e Isocaproato, 3. Isoleucina, 4. Leucina, 5. Valina, 6. Propionato, 7. 3-Aminoisobutirato, 8. Hidroxivalerato, 9 Lactato, 10. GABA, 11. Alanina, 12. Lisina, 13. Derivado del etil malonato. 14 Glutarato, 15. Acetato, 16. Glutamato, 17. Glutamina, 18. Glutación (GSH), 19. Piruvato, 20. Ácido succínico, 21. N-N dimetilglicina, 22. GSH+GSSH, 23. Creatina, 24. Colina, 25. GPC+PC, 26. Taurina, 27. Glucosa, 28. Glicerol, 29. Mioinositol, 30 Fosfocolina (PC), 31. Glicerilfosfocolina (GPC), 32. Derivados de UDP, 33. Disulfuro de Glutación (GSSH), 34. UDP, 35. ATP/ADP, 36. Tirosina, 37. Fenilalanina, 38. Formato, 39 ADP.

Ha sido necesaria la separación del espectro de la figura en tres fragmentos ya que la mayor capacidad resolutive del espectro de fase acuosa (respecto a la fase orgánica) hace necesario un mayor escalado del eje X, correspondiente al desplazamiento químico, para la correcta visualización de los datos.

La asignación de metabolitos apolares (o en la fase orgánica de la muestra) adolece de una gran especificidad, limitándose a la identificación de metabolitos agrupados en función de características de su cadena hidrogenada. Esto se debe principalmente a que los núcleos de H de dicha cadena generan una gran cantidad de señal, debido a su número, además de encontrarse en entornos químicos muy similares a lo largo de la cadena lo que repercute en la definición del espectro debido al ensanchamiento de las señales.

En la Figura 5 se pueden observar los metabolitos identificados en la fase orgánica de los espectros, habiéndose seleccionado en este caso únicamente el espectro correspondiente a la retina debido a que se encontraban presentes todos los metabolitos identificados.

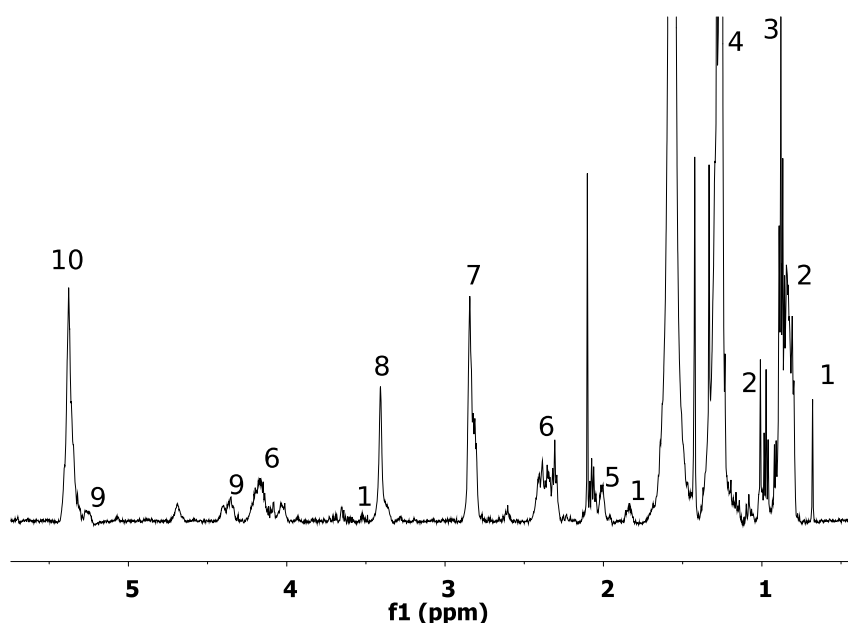


Figura 5: Asignación fase orgánica de retina de ojo de ratón. 1. Colesterol, 2. Lípidos CH₃-CH₂, 3. Etanol, 4. Lípidos CH₂, 5. Lípidos CH₂-CH=CH-, 6. Ésteres grasos, 7. Lípidos -CH=CH-CH₂-CH=CH-, 8. Fosfolípidos, 9. TAG, 10. Lípidos CH=CH

Como se observa en el pie de figura, los lípidos se identifican en función de las insaturaciones o dobles enlaces presentes en su cadena hidrogenada, pudiendo discriminarse entre monoinsaturados y poliinsaturados, incluyendo en algunos casos la distancia presente entre las saturaciones.

En resumen, se han identificado entre ambas fases 49 metabolitos (o grupos de ellos) que se usarán en el análisis de los perfiles metabólicos de cada una de las partes en las que se ha dividido el ojo de ratón.

4.2 Análisis estadístico multivariante.

Se realizan diversos análisis comparativos entre las variedades WT y KO de cada una de las partes, así como de las diferentes partes respecto a datos obtenidos de ojo completo (de un estudio realizado con anterioridad, siendo facilitados dichos datos por la Dra. Martina Palomino).

Por una parte, se realizan análisis multivariantes para establecer la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos muestrales. A continuación, se realiza el análisis univariante de todos los metabolitos en cada una de las comprobaciones para obtener así información específica relacionada con los metabolitos que varían de forma significativa.

4.2.1 Comparativa de las partes del ojo y el ojo completo

Para realizar una primera caracterización de los datos, además de comprobar el grado de similitud y la posibilidad de establecer clases entre las diferentes partes entre sí, se ha realizado un análisis multivariante por componentes principales que permitirá discernir el grado de similitud entre las diferentes partes y el ojo completo. En la Figura 6 se presenta un score plot de dicho análisis.

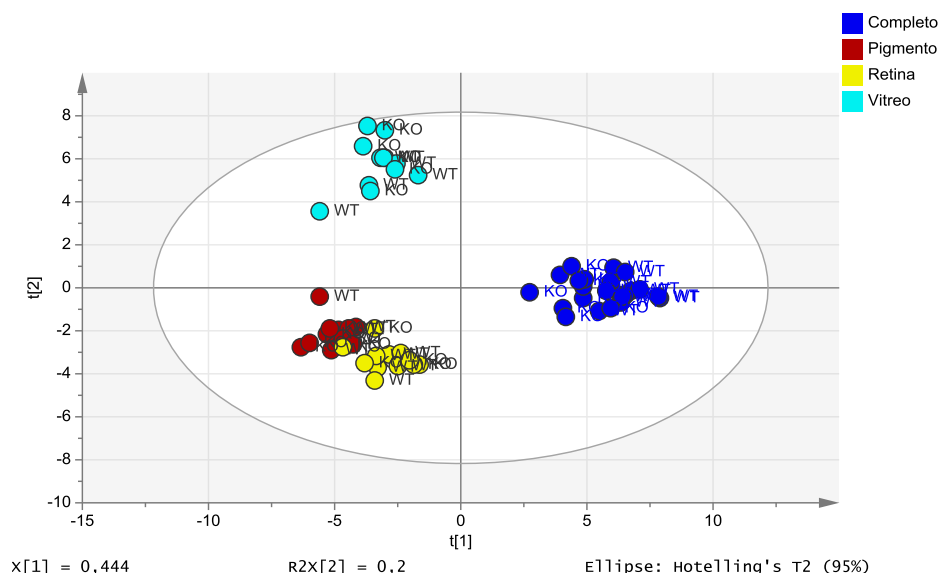


Figura 4: Score plot obtenido del PCA del ojo completo y sus partes.

En este score plot, puede observarse como existe una clara separación entre los perfiles metabólicos del ojo completo y de las diferentes partes. Esto nos demuestra que, aunque el ojo completo sea una suma de sus partes, el análisis estadístico multivariante permite la discriminación de clases en función de los valores medidos de los metabolitos.

Se observa también como existe una marcada separación entre los clústeres formados por las muestras de humor vítreo y las de retina y pigmento, mientras que estas últimas dos partes

se encuentran agrupadas, existen diferencias suficientes para que exista una pequeña separación entre ambos grupos de muestras.

En la Figura 7 se representa el loading plot asociado al score plot anterior, obteniendo la información de los metabolitos asociados a dicha separación. Los puntos presentan una diferenciación de color en función de la fracción donde se encontraba el metabolito, correspondiéndose FA (azul) con fase acuosa y FO (rojo) con fase orgánica.

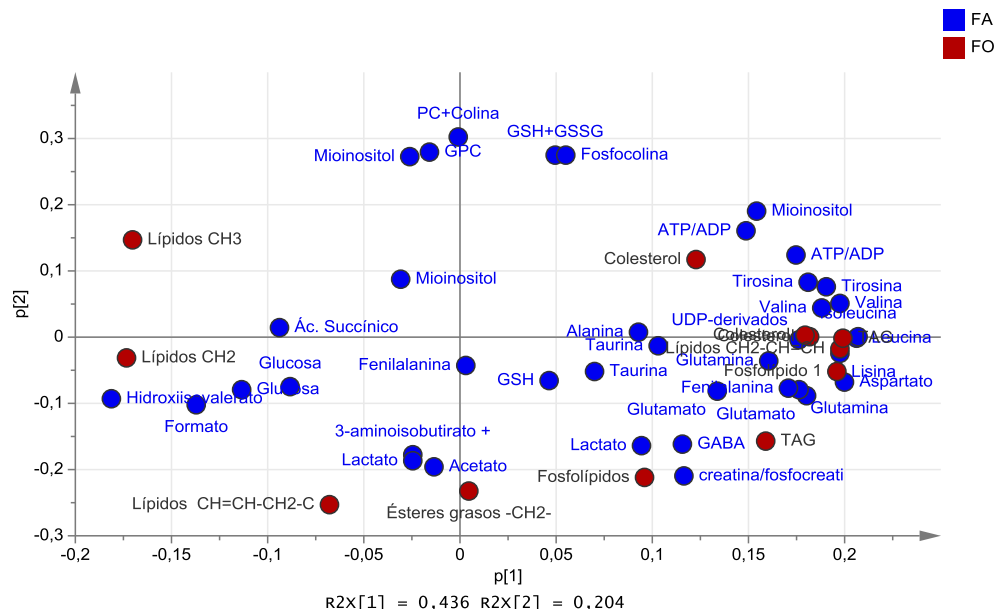


Figura 5: Loading plot de la comparativa entre el ojo completo y sus partes.

Este loading plot presenta un menor número de metabolitos debido a que solo se han incluido los metabolitos que son comunes para cada tejido. Es destacable la menor densidad de metabolitos en la zona del humor vítreo, concordando esta con la ausencia de actividad metabólica y celular en el mismo al tratarse de un líquido producido en las etapas tempranas del desarrollo el cual no se renueva, además de otras diferencias en la composición de las partes: una mayor cantidad de derivados de la colina en el humor vítreo; lípidos insaturados, glucosa y lactato en pigmento y retina; y una mayor concentración de aminoácidos en el ojo entero.

Por último, puede observarse que no existe una diferenciación visible entre los tipos de muestra (KO o WT) dentro de cada uno de los clústeres, indicando que, aunque existan diferencias entre estas muestras son significativamente más pequeñas que las observadas en el análisis comparativo entre el ojo completo y sus partes. Por lo tanto, para poder detectar estas diferencias, en un siguiente análisis más detallado se han realizado PCAs individuales para cada parte del ojo.

4.2.2 Humor vítreo

Como puede apreciarse en la Figura 8, el score plot de humor vítreo también presenta separación entre los clústeres de WT y KO a excepción de uno de los ojos correspondientes a WT2, que en el análisis se asemeja más al clúster de los KO que al de los WT. La PC1 explica un 25,91% de la variación entre las muestras.

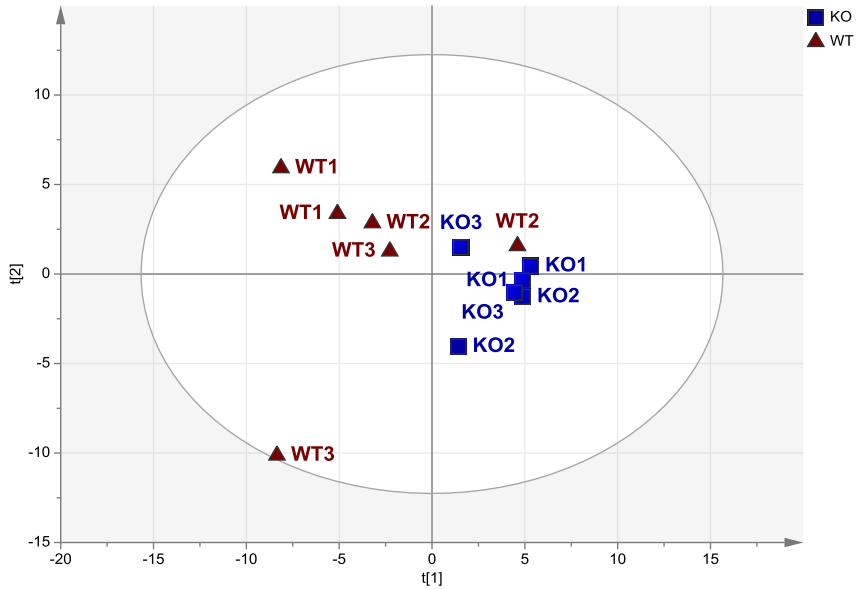


Figura 6: Score plot de humor vítreo WT y KO

En la Figura 9 se presenta el loading plot asociado a la comparación de retina, donde se encuentran marcados de manera diferencial los metabolitos significativos como SIGN, diferenciando además entre los presentes en la fase orgánica o la fase acuosa.

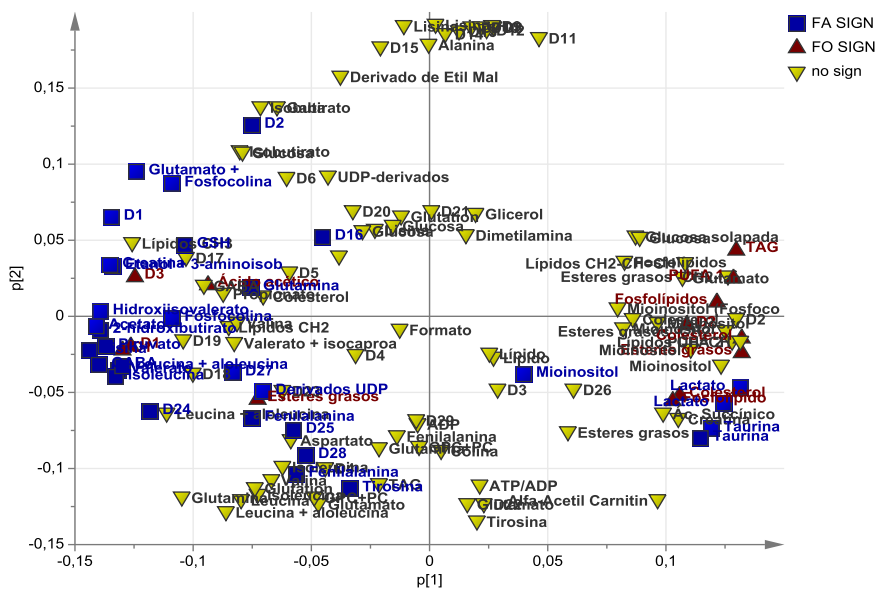


Figura 7: Loading plot de humor vítreo WT y KO.

4.2.3 Retina

En la Figura 10 se presenta el score plot obtenido por el PCA de retina WT y KO. Se aprecia una separación en base a la PC1 de ambas cepas, representando esta componente el 33% de variación.

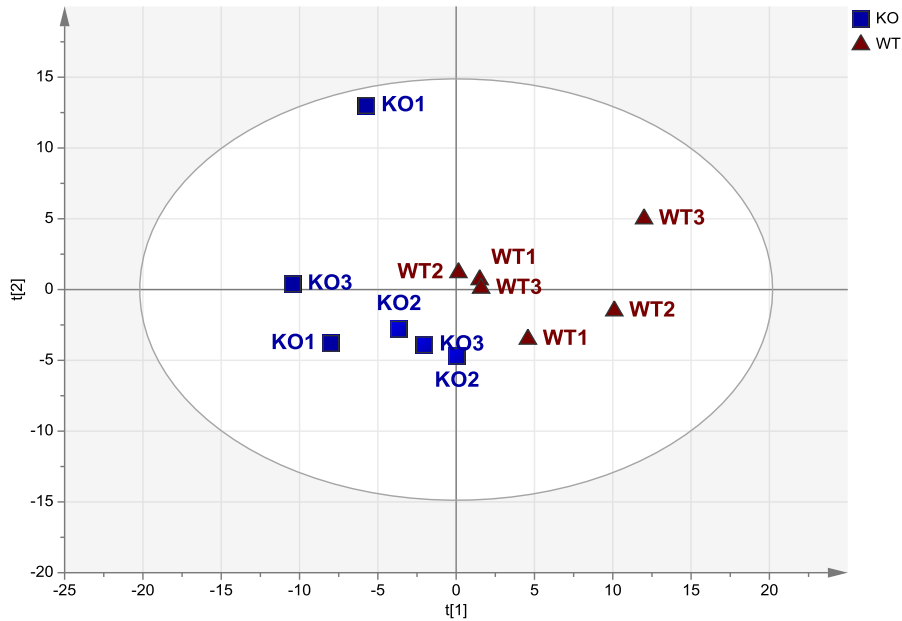


Figura 8: Score plot retina WT y KO.

A continuación, en la Figura 11 se muestra el loading plot obtenido en la comparación de retina WT y KO, con los metabolitos diferenciados entre significativos en la fase acuosa y no significativos (con independencia de su fase).

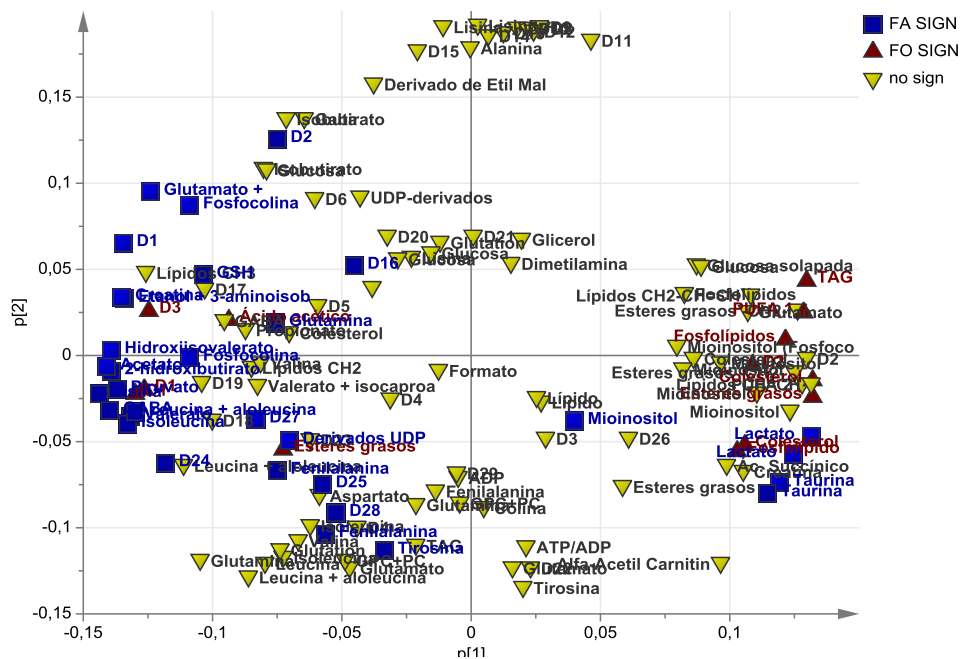


Figura 9: Loading plot de retina WT y KO.

4.2.4 Pigmento

Para finalizar, se recoge en la Figura 12 el score plot obtenido de la comparación de la parte correspondiente a pigmento, donde se aprecia una buena separación entre ambos clústeres. La PC1 explica en este caso el 34,02% de variación entre los clústeres.

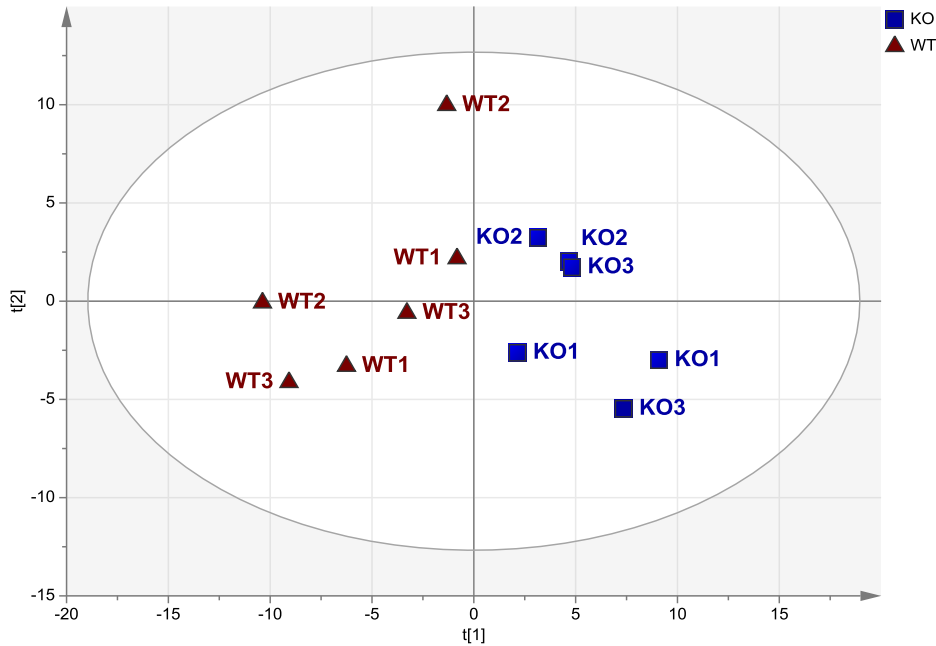


Figura 10: Score plot de pigmento WT y KO.

Por último, el loading plot de pigmento WT y KO en la Figura 13.

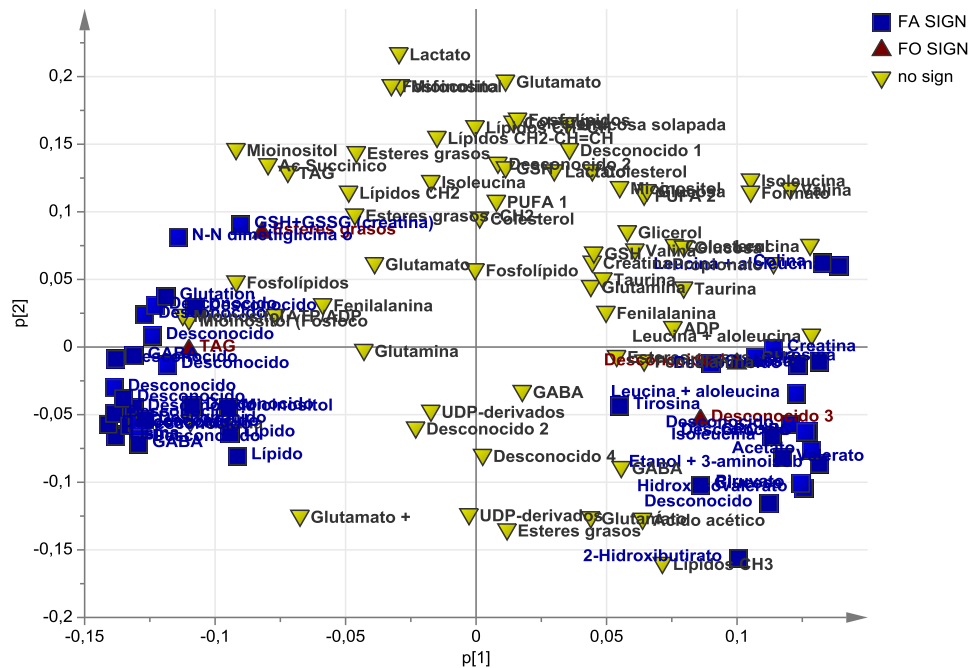


Figura 11: Loading plot de pigmento WT y KO.

4.3 Análisis estadístico univariante de metabolitos con variaciones significativas.

4.3.1 Fase acuosa

Para obtener una información más detallada de las diferencias observadas, se procede a continuación al análisis univariante de los metabolitos con variación significativa entre las fases acuosas de las cepas WT y KO. Por una parte, se realizará de manera gráfica utilizando los boxplots obtenidos con el software R ya que estos proporcionan información a respecto a la distribución de los diferentes valores como son los cuartiles y la mediana. Los boxplots de retina, pigmento y humor vítreo se corresponden con las Figuras 14, 15 y 16 respectivamente.

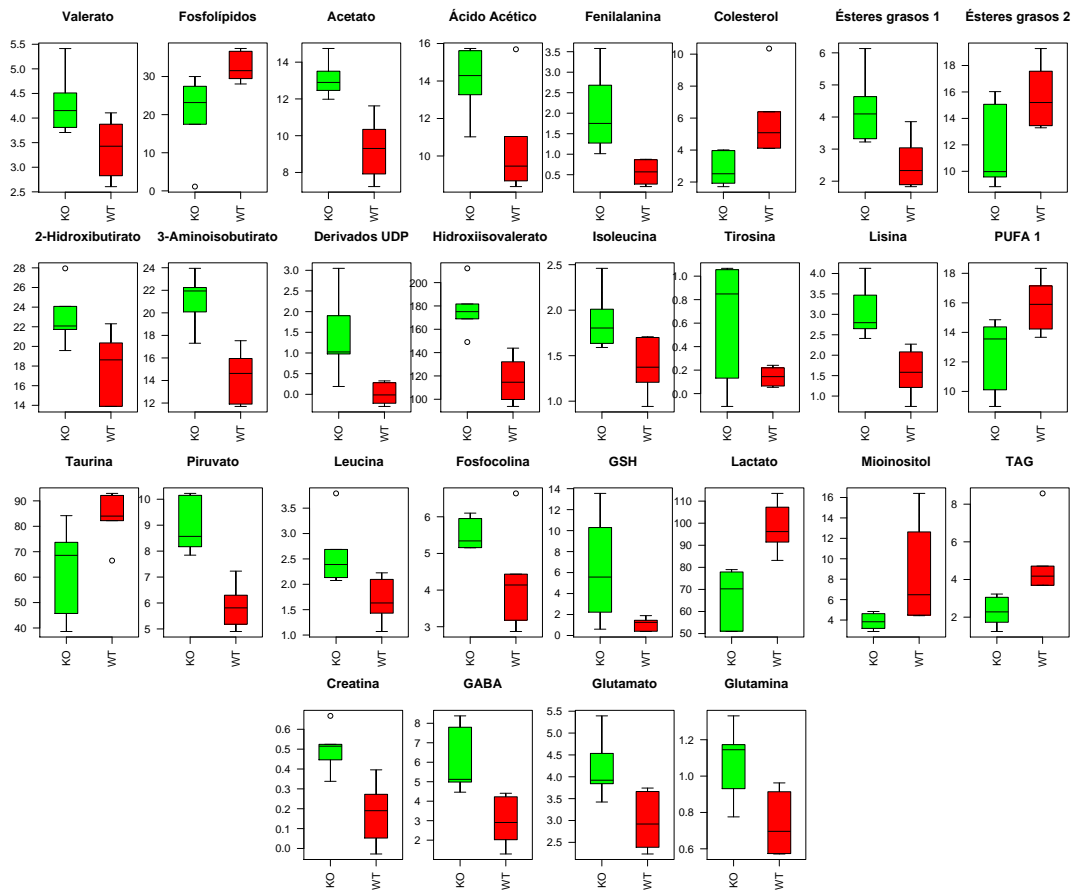


Figura 12: Boxplots de los metabolitos con variaciones significativas de retina.

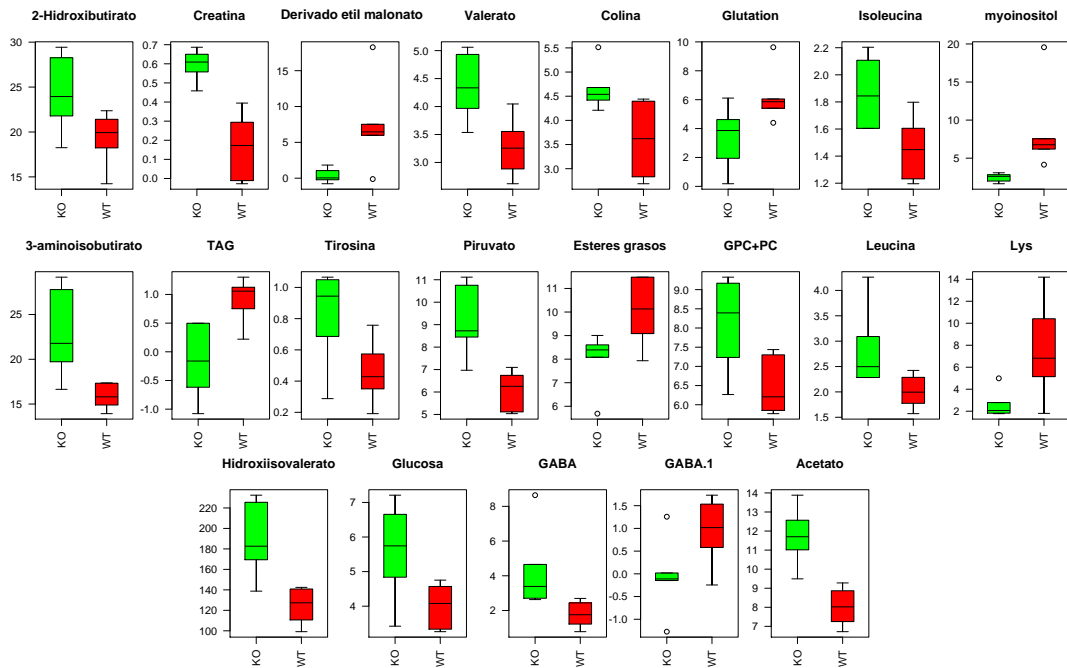


Figura 13: Boxplots de metabolitos con variaciones significativas de pigmento.

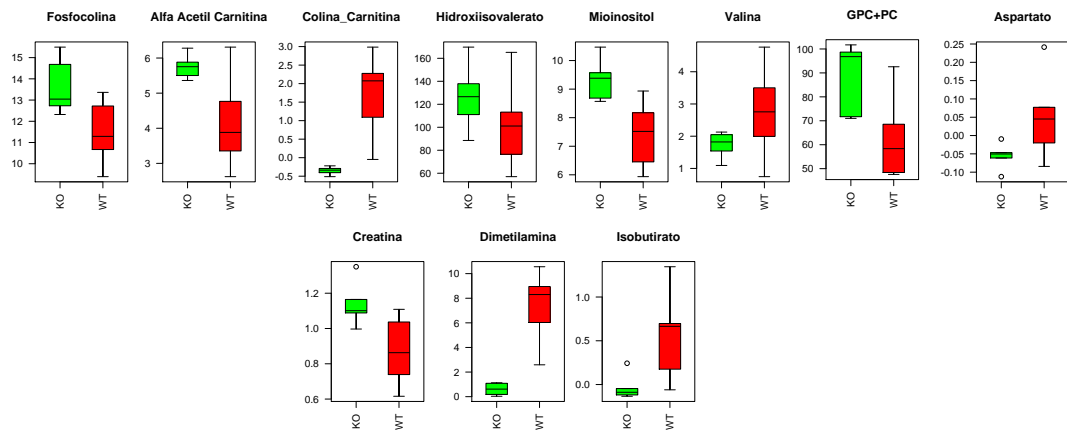


Figura 14: Boxplots de metabolitos con variaciones significativas de humor vítreo.

Por otra parte, se incluye un listado de los metabolitos que varían significativamente, incluyendo los descriptores estadísticos asociados a los mismos, permitiendo evaluar su variación relativa mediante el fold change. Debido a la normalización previa de los valores, sus medias se corresponden con las áreas relativas en los espectros obtenidos, aunque su abundancia relativa entre las muestras sigue siendo comparable. Las tablas de los metabolitos de retina, humor vítreo y pigmento se corresponden con las Tablas 3, 4 y 5 respectivamente.

Tabla 3: Metabolitos con variaciones significativas en retina (FA).

Metabolitos	WT		KO		Fold Change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
2-hidroxiacetato	19,351	1,175	23,239	1,508	0,2	0,038
Acetato	8,026	0,429	11,558	0,666	0,44	0,001
Colina	3,6	0,309	4,477	0,075	0,24	0,015
Gaba	2,001	0,329	0,791	0,298	-0,61	0,013
Glucosa	5,014	0,799	9,498	2,171	0,89	0,043
Glutarato	1,774	0,317	3,352	0,372	0,89	0,033
Glutati3n	6,2	0,728	3,729	0,892	-0,4	0,033
GPC+PC	6,462	0,298	8,006	0,529	0,24	0,015
Hidroxiisovalerato	124,629	7,476	179,79	13,005	0,44	0,003
Isoleucina	1,454	0,095	1,82	0,109	0,25	0,017
Leucina	0,8	0,16	1,233	0,053	0,54	0,022
Lisina	3,784	0,783	1,629	0,268	-0,57	0,022
Mioinositol	8,496	2,267	2,386	0,232	-0,72	0,024
Piruvato	6,083	0,346	8,724	0,555	0,43	0,002
Tirosina	0,335	0,021	0,464	0,047	0,39	0,018
Valerato	3,269	0,211	4,318	0,267	0,32	0,007

Tabla 4: Metabolitos con variaciones significativas en humor v3treo (FA).

Metabolitos	WT		KO		Fold change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
ADP	0,869	0,211	2,159	0,244	1,48	0,003
Alfa-acetil carnitina	4,136	0,539	5,755	0,132	0,39	0,015
ATP/ADP	0,805	0,187	1,95	0,167	1,42	0,001
Colina	1,742	0,435	-0,35	0,042	-1,2	0,001
Creatina	0,425	0,045	0,735	0,11	0,73	0,026
Dimetil amina	7,455	1,147	0,609	0,193	-0,92	0
Fenilalanina	0,4	0,072	0,666	0,088	0,67	0,042
Fosfocolina	11,454	0,6	13,553	0,511	0,18	0,024
Glutamina	6,106	0,453	4,941	0,248	-0,19	0,048
GPC+PC	62,31	6,987	89,451	5,775	0,44	0,013
GSH+GSSG	3,862	0,544	5,355	0,265	0,39	0,033
Isobutirato	0,581	0,199	-0,039	0,058	-1,07	0,014
Mioinositol	7,422	0,453	9,344	0,281	0,26	0,005

Tabla 5: Metabolitos con variaciones significativas en pigmento (FA).

Metabolitos	WT		KO		Fold change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
2-hidroxiubutirato	17,95	1,404	22,915	1,165	0,28	0,022
Acetato	9,288	0,699	13,082	0,392	0,41	0,001
Derivados de UDP	0,011	0,104	1,361	0,403	121,65	0,009
Fenilalanina	0,56	0,117	2,008	0,394	2,58	0,006
Fosfocolina	4,233	0,543	5,508	0,17	0,3	0,049
Fosfocolina	1,86	0,363	3,762	0,649	1,02	0,029
Glutamato	2,978	0,272	4,173	0,284	0,4	0,013
Glutamina	0,736	0,07	1,083	0,081	0,47	0,009
Glutarato	2,96	0,503	5,978	0,679	1,02	0,005
GSH	1,105	0,249	6,301	2,049	4,7	0,031
Hidroxiisovalerato	116,468	8,344	177,023	8,442	0,52	0
Isoleucina	1,384	0,123	1,884	0,133	0,36	0,02
Lactato	97,95	4,461	66,566	5,313	-0,32	0,001
Leucina	1,681	0,177	2,577	0,263	0,53	0,018
Lisina	1,579	0,233	3,041	0,262	0,93	0,002
Mioinositol	8,482	2,044	3,865	0,325	-0,54	0,05
Piruvato	5,873	0,357	8,921	0,416	0,52	0
Taurina	83,635	3,894	63,224	7,119	-0,24	0,031
Tirosina	0,145	0,033	0,64	0,206	3,43	0,039
Valerato	3,378	0,252	4,29	0,253	0,27	0,029

4.3.2 Fase orgánica

Se realiza el mismo procedimiento para los metabolitos de la fase orgánica.

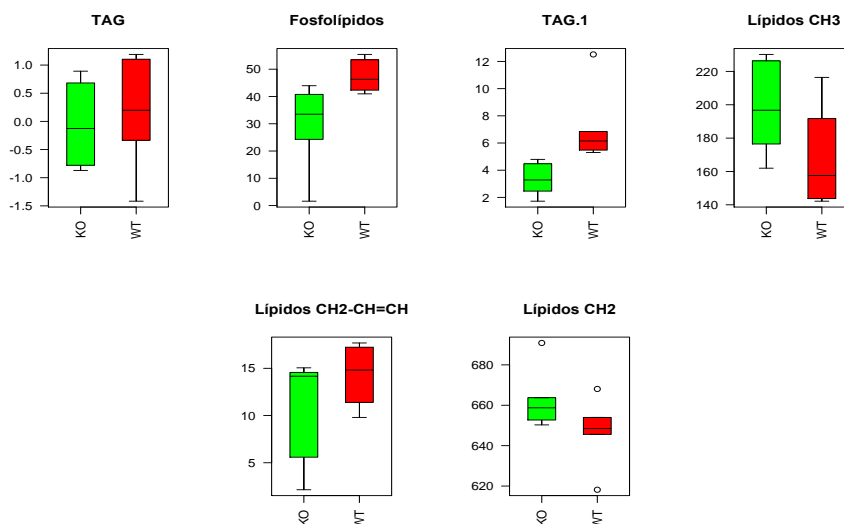


Figura 15 Bloxplots de metabolitos de retina (FO)

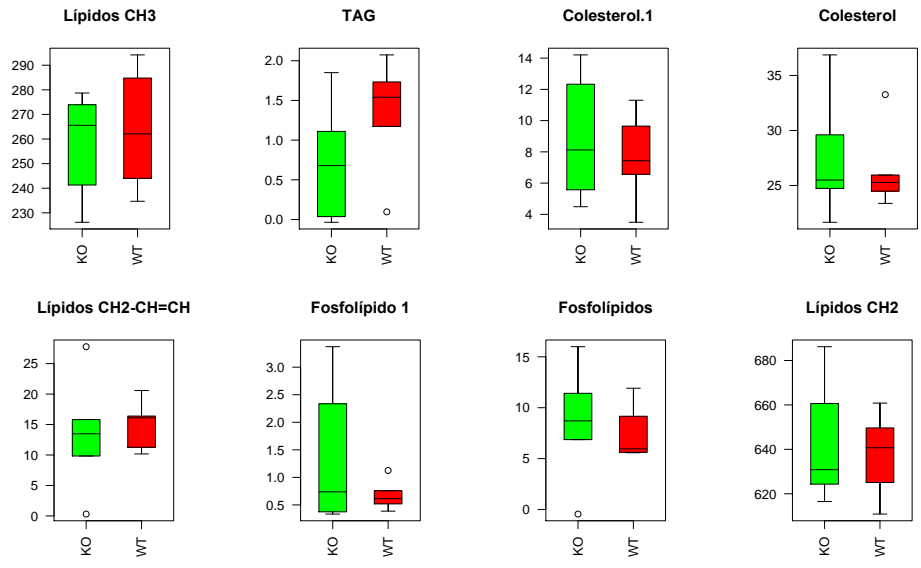


Figura 16: Boxplots de metabolitos de humor vítreo (FO)

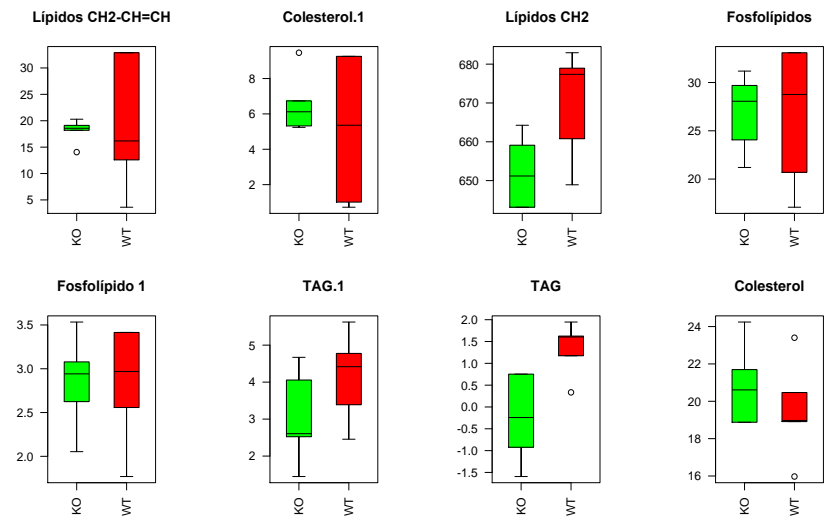


Figura 17 Boxplots de metabolitos de pigmento (FO).

Tabla 6: Metabolitos en retina (FO)

Metabolitos retina	WT		KO		Fold change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
Colesterol	6,855	1,004	6,568	0,591	-0,04	0,559
Lípidos CH3	168,199	30,068	198,064	28,567	0,18	0,108
Colesterol	21,643	2,354	21,735	1,316	0,00	0,935
Lípidos CH2	647,118	16,333	662,504	14,781	0,02	0,118
Colesterol	8,563	3,481	4,024	1,531	-0,53	0,015
Lípidos CH2-CH=CH	14,291	3,158	10,946	5,606	-0,23	0,232
Ésteres grasos -CH2-COO-	48,168	4,550	41,284	7,347	-0,14	0,080
Lípidos CH=CH-CH2-CH=CH-	23,224	2,894	18,182	3,894	-0,22	0,029
Fosfolípidos	47,466	5,921	29,603	15,586	-0,38	0,025
TAG	0,156	0,971	-0,055	0,802	-1,35	0,691
Fosfolípido	7,242	1,608	3,808	3,260	-0,47	0,043
TAG	7,075	2,724	3,336	1,179	-0,53	0,012

Tabla 7: Metabolitos en pigmento (FO)

Metabolitos pigmento	WT		KO		Fold change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
Colesterol	6,958	1,208	6,968	0,723	0,00	0,987
Lípidos CH3	189,898	32,254	211,901	13,783	0,12	0,155
Colesterol	19,450	2,429	20,818	2,007	0,07	0,313
Lípidos CH2	671,057	13,294	652,005	8,684	-0,03	0,015
Colesterol	5,160	3,776	6,498	1,602	0,26	0,443
Lípidos CH2-CH=CH	19,051	11,705	18,131	2,142	-0,05	0,854
Ésteres grasos -CH2-COO-	39,159	4,137	36,9279	2,136	-0,06	0,268
Lípidos CH=CH-CH2-CH=CH-	13,941	1,490	14,107	1,637	0,01	0,858
Fosfolípidos	26,911	6,800	27,042	3,721	0,00	0,968
TAG	1,380	0,568	-0,249	0,949	-1,18	0,005
Fosfolípido 1	2,848	0,631	2,862	0,501	0,00	0,968
TAG	4,179	1,109	2,984	1,170	-0,29	0,100

Tabla 8: Metabolitos en humor vítreo (FO)

Metabolitos vitreo	WT		KO		Fold change	t-Student
	Media	SEM	Media	SEM		
Colesterol	6,343	1,710	7,552	1,270	0,19	0,195
Lípidos CH3	263,651	22,849	258,547	20,497	-0,02	0,692
Colesterol	26,270	3,533	27,307	5,326	0,04	0,700
Lípidos CH2	637,973	18,370	641,559	26,618	0,01	0,791
Colesterol	7,645	2,731	8,806	3,882	0,15	0,562
Lípidos CH2-CH=CH	15,104	3,814	13,449	8,931	-0,11	0,685
Ésteres grasos - CH2-COO-	28,998	3,611	28,022	5,194	-0,03	0,713
Lípidos CH=CH-CH2-CH=CH-	4,238	1,247	3,604	2,044	-0,15	0,531
Fosfolípidos	7,364	2,612	8,540	5,519	0,16	0,647
TAG	1,359	0,692	0,720	0,729	-0,47	0,150
Fosfolípido 1	0,670	0,255	1,315	1,257	0,96	0,246
TAG	0,383	0,308	0,579	0,811	0,51	0,593

4.4 Interpretación biológica

Se pueden observar niveles altos de glucosa en los tejidos retinales de la cepa KO, al contrario que en el pigmento y el humor vítreo, siendo estos un claro síntoma de la diabetes inducida en los ratones debido a la alteración del gen *Isr2*. Esta variación de los niveles únicamente en la retina nos indica que están causados por un aumento del nivel de glucosa en sangre, ya que este tejido es el que presenta la vascularización del ojo.

Dichos niveles altos de glucosa están relacionados, aunque sin conocer completamente los mecanismos de acción, con daños en los tejidos. Las principales alteraciones vasculares que se producen en relación con la diabetes mellitus, las cuales provocan la retinopatía diabética, son el aumento de la adhesión leucocitaria a las paredes de los vasos sanguíneos y alteraciones en el flujo de sangre, lo que conlleva en ultimo termino a la muerte celular. (Caldwell et al., 2003)

El acetato o ácido acético se encuentra asociado a la regulación de los niveles de glicemia por una vía alternativa a la insulina, mediante la regulación a través de quinasas activadas por AMP (Hardie et al., 2003), (Hardie et al., 2004). Por ello, el aumento de dicho metabolito en respuesta a niveles altos de glucosa, como en el caso de los datos obtenidos en retina, es una consecuencia lógica del proceso de regulación de los niveles de hiperglucemia existentes.

Gran parte de las alteraciones asociadas a la diabetes consisten en alteraciones del metabolismo energético, entre las cuales se incluyen alteraciones en los niveles de ATP y ADP, como consecuencia directa de la mayor concentración de glucosa en las células que provoca una

sobreactividad de la glucólisis, en este contexto, se observan también valores muy elevados de piruvato como producto final de la glucólisis.

Consecuencia de este aumento existen otros metabolitos asociados al metabolismo energético con concentraciones aumentadas como son la creatina, el UDP, el glutamato; así como se observa un marcado déficit de lactato en el tejido, asociado posiblemente a su relación con la oxidación del NADH.

Metabolismo lipídico

El metabolismo lipídico se encuentra también alterado, mostrando una disminución de la taurina, con su efecto regulador sobre la cantidad de triglicéridos libres además de actuar como antioxidante. (Chen et al. 2016).

La resistencia a la insulina, provoca el aumento de ácidos grasos libres al no darse la acción inhibitoria de la insulina sobre la lipólisis. Este exceso en la cantidad de ácidos grasos libres no puede ser controlado almacenándose en el tejido adiposo, por lo que se mantiene su elevada concentración en los tejidos no adiposos. (Kusminski et al., 2009)

Esta elevada concentración influye también en mecanismos reguladores del transporte de los ácidos grasos, como la alfa-acetil carnitina.

Metabolismo de los aminoácidos:

Existen también alteraciones de las concentraciones de diversos aminoácidos, como un aumento de la fenilalanina, glutarato, leucina, isoleucina y tirosina. En algunos de estos casos, dicho aumento está relacionado con el piruvato al ser el precursor común en las rutas bioquímicas de dichos aminoácidos. En cambio, otros aminoácidos ven reducida su concentración, como la glutamina o la lisina, estando esta última relacionada con la ruta de señalización AGE- RAGE de la insulina.

Vascularización

El sistema AGE-RAGE se encuentra también implicado en procesos de angiogénesis, característicos de la retinopatía diabética. Uniendo esto a la disminución de compuestos como la colina y la fosfocolina, relacionados con la integridad celular y procesos de arterioesclerosis, dan como resultado la formación de nuevos sistemas vasculares de poca resistencia propensos a sufrir roturas provocando hemorragias.

Compuestos antioxidantes

Se observa además una marcada disminución de los compuestos antioxidantes como el glutatión en pigmento y humor vítreo, mientras que aumenta su cantidad en pigmento. La RMN permite la medición de este compuesto en su forma reducida de manera directa, mientras que su forma oxidada se detecta solapada con la anterior, lo que podría explicar el aumento de la medición en pigmento de KO.

La reducción de compuestos antioxidantes en la célula nos aporta información respecto al estrés oxidativo que sufre la célula. En el caso de los ratones KO los niveles observados indican que disminuye el glutatión en su forma reducida mientras que aumenta su forma oxidada.

La hiperglucemia provoca aumentos del estrés oxidativo por diversos mecanismos, como la activación de proteínas C debido al aumento de la concentración de diglicéridos, produciendo estas proteínas especies reactivas del oxígeno (ROS), o la reacción no enzimática de la glucosa con aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos.

El aumento de este estrés oxidativo ha demostrado estar relacionado con la aparición de retinopatía diabética en casos de diabetes mellitus (Kowluru, 2003). La disminución de compuestos antioxidantes como el glutatión, que reducen los efectos dicho estrés, favorecen la aparición de esta complicación.

4.5 Estudio de afectación de rutas metabólicas

Existen diversas utilidades web y bases de datos disponibles de acceso público para el estudio de las rutas metabólicas asociadas a variaciones en la concentración de metabolitos. La *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) está orientada a estudios genómicos y metagenómicos, conteniendo información sobre 460.131 rutas metabólicas, además de información asociada a metabolitos (17.748) y reacciones bioquímicas (1.246) entre otros conjuntos de datos. En este trabajo se ha utilizado para obtener información respecto a rutas metabólicas asociadas a los metabolitos con variación significativa.

La segunda herramienta utilizada para el análisis de los metabolitos ha sido PaintOmics, una herramienta desarrollada por el departamento de bioinformática del CIPF que permite el estudio de rutas metabólicas relacionadas entre sí de manera sencilla, aceptando la introducción de datos provenientes de todas las técnicas “ómicas”.

En la Figura 17, se observan las rutas metabólicas agrupadas por clases que están relacionadas con los metabolitos que varían significativamente en las muestras analizadas.

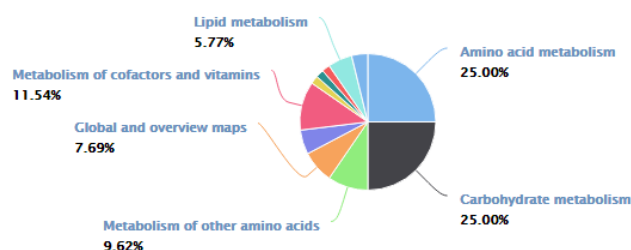


Figura 18: Clases de rutas metabólicas asociadas a los metabolitos analizados.

Se observa que un 25% de las rutas están asociadas a el metabolismo de los aminoácidos, y otro 25% está asociado al metabolismo de los carbohidratos. De manera más minoritaria se encuentran afectadas otras rutas metabólicas agrupadas en el metabolismo de lípidos (5,77%), vitaminas y cofactores (11,54 %) y otros aminoácidos (9,62 %).

Se obtiene además un listado de las rutas metabólicas con el número de metabolitos contenidos en el set de datos que se encuentran dentro de ellas. Se presentan las rutas con mayor número de metabolitos asociados a ellas en la Tabla 5

Tabla 9: Listado de rutas metabólicas con mayor número de metabolitos incluidos.

Ruta metabólica	Metabolitos
Biosíntesis de aminoácidos	8
Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico.	7
Glicolisis y gluconeogénesis	6
Metabolismo del carbono	5
Metabolismo del ácido cianoamino	4
Metabolismo de la Taurina e Hipotaurina	4
Metabolismo del piruvato	4
Metabolismo de arginina y prolina	4
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	4
Metabolismo de la fenilalanina	4
Metabolismo de D-Glutamina y D-glutamato	4

Esta herramienta permite también la obtención de imágenes representativas de la evaluación de la asociación entre diferentes rutas metabólicas representadas en los datos de entrada, como se puede apreciar en la Figura 18.

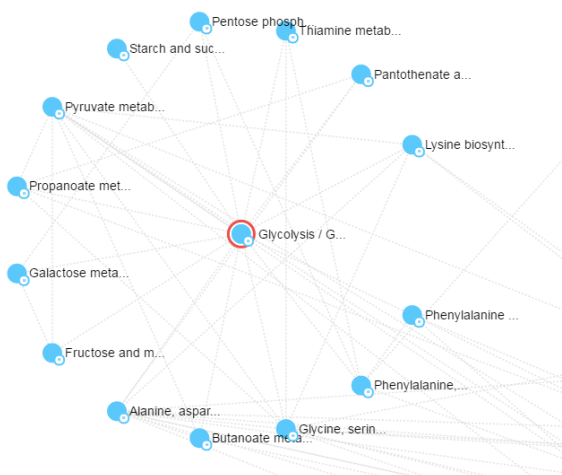


Figura 19: Rutas metabólicas relacionadas

5 CONCLUSIONES

1. Se han elaborado perfiles metabolómicos de las partes del ojo de ratón, usando los espectros de RMN, identificando un numero razonable de metabolitos en las muestras tanto de la fase acuosa como de la fase orgánica. Se han obtenido un total de 36 muestras usando los ojos de 6 ratones, cuyo resto de material biológico se ha destinado a otros estudios.
2. Se ha comprobado que los perfiles metabolómicos obtenidos eran adecuados para su posterior análisis estadístico y que existían diferencias apreciables aplicables tanto entre las tres partes del ojo entre ellas como con el ojo entero. Esto podría utilizarse en futuro estudios para comprobar la efectividad de un tratamiento, por ejemplo.
3. Se ha realizado la evaluación estadística de las diferencias de concentración de los metabolitos, obteniendo información respecto a su función y rutas bioquímicas alteradas, observándose una mayor afectación en las rutas de síntesis de aminoácidos, el metabolismo de la glucosa y el del carbono.

6 BIBLIOGRAFÍA

- BASTAKI, S., (2005). Diabetes mellitus and its treatment. *Diabetes mellitus and its treatment. International journal of Diabetes and Metabolism*, 13.3: 111.
- BECKONERT, O.; COEN, M; KEUN, H.C.; WANG, Y.; EBBELS, T.M.D.; HOLMES, E.; et al. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols*, 2(11), 2692-2703.
- CALDWELL, R.B.; BARTOLLI, M; BEHZADIAN, M.A.; EL-REMESSY, A.E.; AL-SHABRAWAY, M; PLATT, D.H.; et al. (2003) Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*, 19: 442-455.
- CHEN, W.; GUO, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. (2016) The beneficial effects of taurine in preventing metabolic syndrome, *Food Funct*, 1849-63.
- DUNN, W.B.; BAILEY, N.J.; JOHNSON, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130: 606-625.
- HARDIE, D.G. (2004). AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 5 119–125.
- HARDIE, D.G. (2003). J.W. Scott, D.A. Pan, E.R. Hudson, Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system, *FEBS Lett*. 546 113–120
- HOOD, L.; HEATH, J.R.; PHELPS, M.E.; LIN, B. (2004), Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science*, 306: 640-643
- KOWLURU, R.A. (2003). Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*, 52: 818-823.
- KUMINSKI, C.M.; SHETTY, S.; ORCI, L.; UNGER, R.H.; SCHERER, P.E. (2009). Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*, 14:1484-1495.
- NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; LINDON, J.C.; WILSON, I.D. (2004). The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nature biotechnology*. 22.10: 1268-1274
- NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; LINDON, J.C.; WILSON, I.D. (2007). Metabolomics and metabolomics techniques and their applications in mammalian systems. En: *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier, The Netherlands, 1-34.
- ROCHFORT S. (2005). Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of natural products*. 68.12, 1813-1820.
- WISHART DS, JEWISON T, GUO AC, WILSON M, KNOX C, et al., HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013. Jan 1;41(D1):D801-7. 23161693
- ZEISEL, SH; DA COSTA, K-A. Choline: An Essential Nutrient for Public Health. *Nutrition reviews*. 2009;67(11):615-623

6.1 Bibliografía de Consulta

BUTLER, A. E.; JANSON, J; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R. A.; Butler, P. C. (2003). β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(1), 102-110.

CLEMENTS, R S.; REYNERTSON, R. (1977) Myoinositol metabolism in diabetes mellitus: Effect of insulin treatment. *Diabetes*, 1977, vol. 26, no 3, p. 215-221.

LUO, X.; LI, R.; YAN, L-J. (2015). Roles of Pyruvate, NADH, and Mitochondrial Complex I in Redox Balance and Imbalance in β Cell Function and Dysfunction. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 512618.

SHULMAN G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 106(2), 171-176.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP (2004) Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Archives of Ophthalmology*, vol. 122, no 11, p. 1631.