

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## Estudio del perfil metabólico de órganos de ratón por resonancia magnética nuclear e identificación de biomarcadores

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Pablo Antonio Antón García

COTUTORA: Dra. Martina Palomino Schätzlein

TUTORA: Dra. María Pilar López Gresa

*Curso Académico: 2014/2015*

VALENCIA, julio de 2015





### Datos personales

Nombre y apellidos: Pablo Antonio Antón García

### Datos del trabajo fin de grado

Título: Estudio del perfil metabólico de órganos de ratón por resonancia magnética nuclear e identificación de biomarcadores.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a (académico): María Pilar López Gresa

Cotutor/a: Martina Palomino Schätzlein

Fecha de lectura: Julio 2015

### Resumen

La Metabolómica se define se define como el estudio global de los perfiles de metabolitos de un sistema (célula, tejido u organismo) bajo unas determinadas circunstancias. En el presente trabajo se ha determinado por primera vez el perfil metabólico de ojos, timo, pulmón, vesícula, tráquea y piel de ratón por RMN, tanto a partir de extracto como utilizando muestras de tejido intacto analizadas mediante HRMAS. La información obtenida, tanto en materia de identificación de metabolitos como de perfil metabólico, resulta de una gran utilidad para futuros estudios metabolómicos. De igual manera, se ha realizado por primera vez una comparación exhaustiva del análisis de tejido intacto por HRMAS y del análisis a partir de extractos de órganos de ratón, valorándose las ventajas y desventajas de cada método. Finalmente, se utilizó la asignación completa de ojos para llevar a cabo un estudio metabolómico aplicado a la retinopatía diabética. Los resultados de este estudio demuestran la existencia de metabolitos significativamente diferenciales entre muestras control y *knock-out*. Por un lado, estos metabolitos demuestran que existen rutas metabólicas alteradas en ojo en estadios temprano de diabetes que pueden contribuir al desarrollo de la retinopatía. Por otro lado, estos metabolitos identificados constituyen perfectos indicadores moleculares en estadio temprano de la enfermedad.

### Palabras clave

Metabolómica, RMN, tejido, HRMAS, biomarcador



## Abstract

Metabolomics is the study of global metabolite profiles in a system (cell, tissue, or organism) under a given set of conditions. In this study, it has been determined for the first time the metabolomic profile of mouse's eye, thymus, lung, gall bladder, trachea and skin by NMR, using polar extract, non-polar extract and intact tissue samples, which have been analyzed by HRMAS. The information obtained is quite useful for future metabolomic studies. Furthermore, for the first time, an intense comparison of intact tissue analysis by HRMAS and extracts of mouse organs has been made, in which the advantages and disadvantages of each method have been assessed. Finally, metabolomic profiles of eyes were used to conduct a metabolomic study applied to diabetic retinopathy. The results of this study demonstrate the existence of differential amounts of metabolites between control and knock-out samples. On the one hand, these metabolites show that there are metabolic pathways altered in the eye in early stages of diabetes that can contribute to the development of retinopathy. On the other hand, these metabolites are perfect molecular identifiers of the early stage of the disease.

## Key words

Metabolomics, NMR, tissue, HRMAS, biomarker

## AGRADECIMIENTOS

Me siento un poco triste escribiendo estas palabras. Nos pasamos cuatro años de nuestra vida en la universidad sin pensar ni siquiera una milésima de segundo en ese “último”: ese último almuerzo, esa última cena, esa última cerveza, esa última fiesta todos juntos, esa última despedida... Y de repente ahí están, todos de una vez; y tú te sientes perdido y desorientado, *like knockin' on heaven's door*.

En primer lugar, agradezco enormemente a la Dra. Martina Palomino del CIPF toda la ayuda que me ha ofrecido para realizar este trabajo, así como su esfuerzo, simpatía y buenos consejos. Sin ella, no podría haberlo sacado adelante. Igualmente agradecido estoy con mis compañeros y compañeras de laboratorio por su compañía y afecto. También en el CIPF, quiero expresar mi gratitud a la Dra. María Jesús Vicent y al Dr. Luke Noon por proporcionarme el material biológico para realizar este TFG. Asimismo, aprovecho estas líneas para expresar mi gratitud a la Dra. María Pilar López (Mapi) por su amabilidad conmigo y las recomendaciones que me ha dado.

En Valencia no sólo me he formado como Biotecnólogo, sino que he dado pasos de gigante en mi formación como persona. Evidentemente, esto no lo podría haber hecho si no fuera por mis amigos. Por vosotros, los Xixos, recorrería las distancias más largas y volvería una y otra vez a todos los momentos que hemos compartido. Por eso mismo, cuando llegue el momento, jamás me atreveré a decir “Adiós”, sino un sincero [y bañado en lágrimas] “Hasta luego”.

Pero ellos no han sido los únicos, y por eso tengo que daros las gracias a todos los que os habéis cruzado conmigo. Con todos he compartido momentos inolvidables. Gracias por hacerme sentir querido y valorado.

De igual manera, veo necesario agradecer a esos amigos en la sombra que nunca han dejado de quererme y apoyarme: mis amigos de Torrevieja; los buenos; los de toda la vida. Aquellos que hicieron hueco [y me gusta pensar que me lo he ganado] a aquel chico que se equivocó de clase el primer día de colegio, hace ya más de nueve años. Gracias.

Por último, este trabajo está dedicado enteramente a mi familia. Y también estas palabras: por muy lejos que me lleven mis sueños, nunca olvidaré el camino a casa.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.	La Metabolómica en el contexto de la Biología de Sistemas.....	1
2.	Aplicaciones de la Metabolómica. ....	1
3.	Técnicas analíticas utilizadas en Metabolómica. ....	2
4.	Esquema de trabajo de un estudio metabolómico por RMN.....	3
4.1.	<i>Extracción de metabolitos y preparación de muestras.</i> .....	4
4.2.	<i>Adquisición de espectros.</i> .....	4
4.3.	<i>Asignación e integración de espectros</i> .....	6
4.4.	<i>Análisis estadístico multivariante.</i> .....	6
4.5.	<i>Interpretación biológica.</i> .....	6
5.	Modelos animales en experimentación. ....	7
6.	Diabetes mellitus.....	8
6.1.	<i>Diabetes mellitus tipo I.</i> .....	8
6.2.	<i>Diabetes mellitus tipo II.</i> .....	8
6.3.	<i>Complicaciones que afectan al sistema visual: retinopatía diabética</i> .....	9
6.4.	<i>Modelos animales para el estudio de diabetes mellitus tipo II.</i> .....	9
II.	OBJETIVOS.....	10
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
1.	Material biológico.....	11
2.	Extracción de metabolitos. ....	11
3.	Preparación de muestras para RMN.....	12
4.	Espectroscopia de RMN. ....	12

5. Asignación y cuantificación de metabolitos e identificación.....	13
6. Análisis estadístico multivariante. ....	14
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
IV.a. Resultados y discusión. Parte 1.....	15
1. Asignación de señales e identificación de metabolitos en ojos. ....	15
2. Comparación de perfiles de extractos y de tejido intacto. ....	19
3. Análisis y comparación de perfiles metabólicos de diferentes órganos. ....	21
4. Estimación de los metabolitos más abundantes.....	26
IV.b. Resultados y discusión. Parte 2.....	28
1. Aplicación del análisis del perfil metabólico de ojo al estudio de la retinopatía diabética. ....	28
2. Efecto de la glucosa en alteraciones microvasculares en el ojo. ....	31
3. Efecto del estrés oxidativo en daños oculares. ....	32
4. Toxicidad de los metabolitos de tipo lipídico en diabetes mellitus.....	33
V. CONCLUSIONES .....	34
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	35
VII. ANEXOS.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Principales animales modelo utilizados en investigación y sus aplicaciones más importantes .....	7
Tabla 2. Metabolitos significativamente estadísticos y diferenciales entre muestras WT y KO. ....	30
Figura 1. Etapas de un estudio metabolómico. ....	4
Figura 2. a) Estructura química de la alanina. b) Señal del protón CH <sub>3</sub> de la alanina en un espectro monodimensional. c) Señal del protón CH <sub>3</sub> de la alanina en un espectro bidimensional (HSQC). ....	13
Figura 3. Espectro 1D <sup>1</sup> H RMN de la fase acuosa de ojo adquirido con un espectrómetro de 600 MHz a 27 °C. En rojo: señales correspondientes a lactato. En verde: señales correspondientes a taurina.....	16
Figura 4. Espectro 1D <sup>1</sup> H RMN de la fase orgánica de ojo adquirido en un espectrómetro de 500 MHz a 27 °C.....	17
Figura 5. Espectro 1D <sup>1</sup> H HRMAS de ojo intacto adquirido con un espectrómetro de 500 MHz a 4 °C. En rojo: señales correspondientes a lactato. En verde: señales correspondientes a taurina.....	18
Figura 6. Comparación de espectros según su fase y HRMAS. a) Fase orgánica. b) HRMAS. c) Fase acuosa.....	20
Figura 7. Contribución de cada grupo de metabolitos polares a la composición del perfil metabólico de cada órgano en el extracto de fase acuosa.....	21
Figura 8. Contribución de cada grupo de metabolitos a la composición del perfil metabólico de cada órgano para su extracto de fase orgánica.....	230
Figura 9. Contribución de cada grupo de metabolitos (polares y apolares) a la composición del perfil metabólico de cada órgano según su análisis mediante HRMAS.....	25
Figura 10. Lista de los metabolitos más abundantes identificados y su distribución en cada órgano.....	26
Figura 11. <i>Score Plot</i> del modelo PCA generado por SIMCA. Las muestras WT que entran en el área de muestras KO se muestran señaladas por un círculo rojo.....	28

Figura 12. <i>Loading Plot</i> del modelo PCA generado por SIMCA. Los metabolitos significativos están señalados en color rojo. ....	29
Figura 13. Gráfico de barras del fold change de los metabolitos significativos estadísticamente.....	30

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín Trifosfato
CPMG	Car-Purcell-Meiboom-Gill
DM	Diabetes Mellitus
EM	Espectrometría de Masas
FID	<i>Free Induction Decay</i> . Caída libre de inducción
GSH	Glutation (forma reducida)
GSSH	Disulfuro de Glutation (forma oxidada)
HRMAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i> . Giro al Ángulo Mágico de Alta Resolución
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> . Correlación Heteronuclear de Simple Enlace
IGF1	<i>Insulin Growth Factor 1</i> . Factor de Crecimiento de Insulina 1
IRS2	<i>Insulin Receptor Substrate 2</i> . Sustrato del Receptor de Insulina 2
KO	Ratones <i>knock-out</i> para ISR2
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> . Imagen por Resonancia Magnética
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acid</i> . Ácidos grasos monoinsaturados
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidrogenado (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> . Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> . Análisis de Componentes Principales
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> . Ácidos Grasos Poliinsaturados
RD	Retinopatía Diabética
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> . Especies Reactivas de Oxígeno
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> . Espectroscopia de Correlación Total
TSP	Ácido Trimetilsilil Propanoico
WT	Ratones <i>wild type</i> o sanos

## ÍNDICE DE UNIDADES

μL:	microlitros
μs:	microsegundos
g:	fuerza g
Hz:	hercios
min:	minutos
mm:	milímetros
mM:	milimolar
ms:	milisegundos
°C:	grados centígrados
ppm:	partes por millón
s:	segundos
U.I.N.:	Unidades de Integración Normalizadas
v/v:	volumen/volumen

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. La Metabolómica en el contexto de la Biología de Sistemas.

El ímpetu en desarrollar y mejorar las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos desde principios de la década de los 90 tuvo como resultado la aparición de una nueva disciplina conocida como Genómica. El interés en el tipo de información que aportó la Genómica a la comunidad científica y las oportunidades que abrió en el campo de la investigación hizo que aumentara la atención en este tipo de estudios “ómicos”. A pesar de que se lista un elevado número de ciencias “ómicas”, las tres de mayor impacto son la Genómica, la Proteómica y la Metabolómica.

El desarrollo las ciencias “ómicas” ha permitido la medida de múltiples características de sistemas biológicos complejos a varios niveles de organización biomolecular (Nicholson *et al.*, 2004). Esta aproximación se conoce como Biología de Sistemas, que consiste en la integración computacional de la información genética, transcriptómica, proteómica y metabolómica con la intención de entender todos los elementos moleculares de una célula u organismo (Hood *et al.*, 2004).

Los metabolitos son el producto final de procesos de regulación celular y sus niveles pueden ser considerados como la última respuesta de un sistema biológico a cambios genéticos o ambientales, de manera que proveen una interpretación global (Nicholson *et al.*, 2007).

El conjunto de metabolitos sintetizados por un sistema biológico constituye su metaboloma (Fiehn, 2002). La Metabolómica, incluyendo otras disciplinas afines como la lipidómica, se define como el estudio global de los perfiles de metabolitos de un sistema (célula, tejido u organismo) bajo unas determinadas circunstancias (Rochfort, 2005). En contraste con otras “ómicas”, presenta un alto grado de reproducibilidad biológica y un bajo coste por muestra y análisis (Nicholson *et al.*, 2007).

### 2. Aplicaciones de la Metabolómica.

La Metabolómica es usada para dos propósitos principales: (a) la búsqueda de diferencias entre huellas metabólicas de diferentes poblaciones y (b) comprender e integrar las distintas rutas metabólicas, su relación y el control de la concentración celular de metabolitos y sus fluctuaciones (Fiehn, 2007).

Los estudios de Metabolómica aplicados a Biomedicina generalmente utilizan tres tipos de muestras biológicas como fuente de perfiles metabólicos: biofluidos, células o extractos de tejidos (Beckonert *et al.*, 2007). Debido a la gran versatilidad de las técnicas analíticas utilizadas en Metabolómica, es posible analizar y caracterizar muestras de distintas fuentes biológicas. Además, la técnica de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HRMAS) también permite la caracterización y el análisis metabólico de tejido intacto en fase semisólida (Beckonert, 2010).

La Metabolómica presenta numerosas aplicaciones en el campo de la Biomedicina. Por un lado resulta útil en el fenotipado de diferentes condiciones fisiológicas, puesto que antes de determinar los efectos de una alteración es necesario tener un buen conocimiento del perfil bioquímico en condiciones basales (Bollard *et al.*, 2005). La Metabolómica permite distinguir diferencias entre muestras relacionadas con la dieta, diferencias interespecie, diferencias de sexo o diferencias de edad. Esta técnica también se ha aplicado al fenotipado de animales transgénicos y mutantes con el fin de caracterizar los efectos que produce la introducción o modificación génica (Nicholson *et al.*, 2007; Lehtimaki *et al.*, 2003).

Asimismo, existe mucha literatura sobre el uso de Metabolómica en el campo del estudio y diagnóstico de enfermedades, pudiendo encontrar un elevado número de investigaciones que tratan de establecer biomarcadores para detectar cáncer de mama (Whitehead y Kieber-Emmons, 2005), diabetes mellitus (DM) tipo I y II (Zuppi *et al.*, 2002) o enfermedades coronarias (Kuller *et al.*, 2002), entre otros.

En este ámbito, la Metabolómica aspira a contribuir en el desarrollo de una medicina personalizada, lo que puede llevar a un mayor éxito en el desarrollo de fármacos y en el tratamiento. Para ello, la integración e interpretación combinada de los datos metabólicos junto a estudios genómicos y proteómicos es fundamental. En este campo, uno de los principales retos es superar la variabilidad entre sujetos con respecto a la respuesta ante un fármaco. Para ello es necesario tener presente y caracterizar las influencias tanto genéticas como ambientales que determinan la huella metabólica basal de un individuo (Nicholson *et al.*, 2007; Clayton *et al.*, 2006).

### **3. Técnicas analíticas utilizadas en Metabolómica.**

Las dos técnicas analíticas más extensamente utilizadas en estudios de metabolómica son la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM). El fundamento de ambas técnicas se basa en las

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

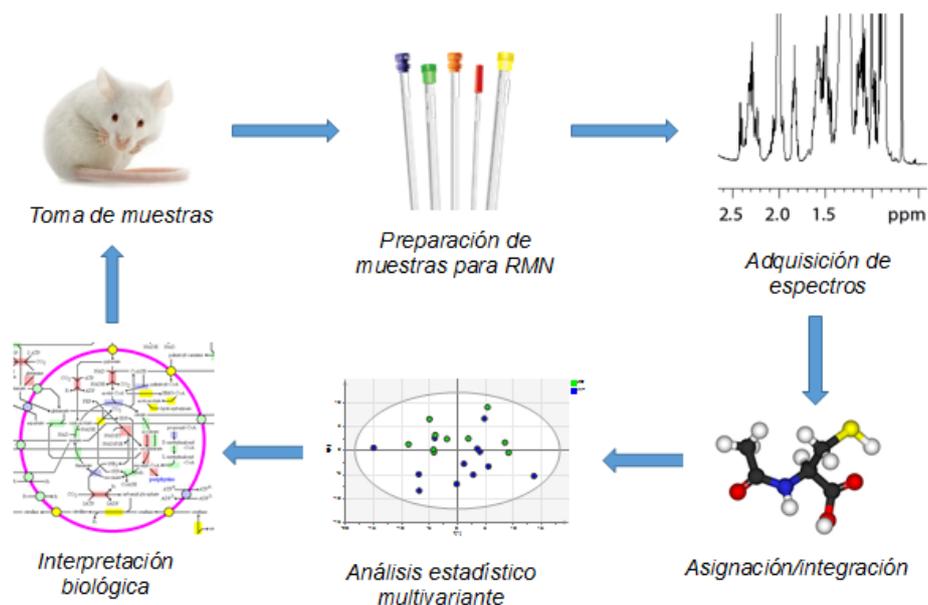
La EM tiene mayor sensibilidad que la RMN pero requiere una etapa separativa de los componentes de la muestra, previa al análisis de los metabolitos. Para ello se utiliza sobretodo la cromatografía de gases tras derivatización química o la cromatografía líquida. Asimismo, dos métodos que están mostrándose prometedoras son la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis capilar (Nicholson *et al.*, 2007).

La espectroscopia de RMN se basa en una medida física de propiedades mecánico-cuánticas de núcleos atómicos con número de spin diferente a 0, tales como el  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ , sometidos al efecto de un campo magnético intenso. Cada compuesto presenta un espectro específico y las diferencias se deben a su naturaleza química y a las condiciones de la muestra/disolvente, pH, concentración de sales, etc. La resolución de los experimentos de RMN pueden mejorarse utilizando experimentos bidimensionales que incluso permiten elucidar la estructura de un compuesto dado (Verpoorte *et al.*, 2007). Las ventajas que presenta el uso de RMN respecto a EM en estudios metabolómicos son numerosas:

- Es una técnica no destructiva y no selectiva.
- Requiere una mínima preparación de la muestra.
- Es altamente reproducible.
- Es de gran utilidad en la identificación y resolución estructural de compuestos.
- La asignación de los compuestos se realiza a través de la información disponible en bases de datos de acceso público.
- Permite el análisis directo de compuestos mediante HR-MAS.

#### **4. Esquema de trabajo de un estudio metabolómico por RMN.**

La espectroscopia de RMN de muestras biológicas requiere considerar muchos parámetros para poder obtener un espectro de RMN de buena calidad. Se debe evitar toda posible fuente de error, así como seguir un protocolo reproducible. Las etapas de las que consta un estudio de este tipo quedan reflejadas en la Figura 1.



**Figura 1. Etapas de un estudio metabolómico.**

#### 4.1. Extracción de metabolitos y preparación de muestras.

El tipo de muestra es determinante a la hora de proceder en la extracción de metabolitos. En el caso de trabajar con tejidos, como se hace en el presente trabajo, una opción es la obtención de una solución de metabolitos a partir de un proceso de extracción. La extracción de metabolitos requiere la ruptura del tejido y el uso de disolventes (Beckonert *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007). La importancia de seleccionar el método más adecuado no debe subestimarse. Considerando reproducibilidad, rapidez y sencillez Lin *et al.*, (2007) recomiendan la extracción usando una mezcla de metanol/cloroformo/agua. Una vez obtenido el extracto, es solubilizado con un disolvente adecuado para el análisis de RMN. Debido a que las señales de los metabolitos en el espectro de RMN pueden variar en función del pH y la cantidad de sales contenida en la muestra. Para muestras acuosas, se opta por una solución tampón como disolvente para minimizar las variaciones (Beckonert *et al.*, 2007). Otra opción es el análisis de tejidos usando la técnica de HRMAS que se realiza con el tejido completo y por lo tanto no requiere de extracción de metabolitos.

#### 4.2. Adquisición de espectros.

El principal experimento de RMN aplicado a la metabolómica es el espectro monodimensional de hidrógeno (1D  $^1\text{H}$ ) debido a la elevada abundancia natural de este núcleo atómico. No obstante, a causa de la complejidad que presentan las muestras de

Metabolómica, que contienen una mezcla de una gran diversidad de compuestos, se han incorporado algunas modificaciones en el experimento 1D  $^1\text{H}$  clásico para obtener espectros de mayor calidad.

- **zgpr.** En este experimento, la señal del agua es saturada a través de una irradiación en la frecuencia del agua. De esta forma queda parcialmente suprimida. Este experimento es cuantitativo si se aplica con un intervalo de relajación de 3-10 segundos.
- **1D NOESY.** Esta secuencia contiene un pequeño periodo de mezcla que mejora la supresión de la señal del agua, la fase y la línea base. Este experimento proporciona un método simple, altamente reproducible y robusto para la adquisición de espectros de RMN de alta calidad en soluciones acuosas, y por lo tanto será la opción aplicada también en la mayoría de análisis del presente trabajo.
- **CPMG.** La secuencia de pulsos Car-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) se utiliza en Metabolómica para la eliminación de señales pertenecientes a especies de elevado peso molecular, mejorando así la resolución de las señales correspondientes a metabolitos de bajo peso molecular. Puede ser especialmente útil cuando se quiere obtener un espectro de HR-MAS, ya que permite visualizar mejor las señales de metabolitos pequeños que generalmente quedan tapadas por los lípidos.

La aplicación de experimentos bidimensionales se ve limitada en Metabolómica debido a sus largos tiempos de adquisición y normalmente sólo se aplica a un grupo seleccionado de muestras. Sin embargo, son de una gran utilidad ya que aumentan la resolución de forma drástica y proporcionan información estructural adicional muy útil.

- **TOCSY.** El experimento de *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) correlaciona un protón con todos los otros protones del mismo sistema de spin (conjunto de protones de una cadena de acoplamientos J, que no esté interrumpido por una constante de acoplamiento muy pequeña). Este experimento es útil en Metabolómica porque nos permite relacionar señales que pertenecen al mismo compuesto.
- **HSQC.** El experimento *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) correlaciona el desplazamiento químico del protón con el desplazamiento químico del carbono directamente unido. Es muy útil en Metabolómica a la hora de asignar señales de un espectro monodimensional, debido a que nos permite diferenciar e identificar señales que pueden aparecer solapadas.

#### 4.3. *Asignación e integración de espectros.*

Para la asignación de las señales más representativas identificadas en los espectros de RMN se emplean bases de datos de acceso público con datos disponibles para miles de metabolitos identificados, o potencialmente identificables, en muestras biológicas. Las bases de datos más utilizadas en metabolómica son la *Human Metabolome Database* (HMDB) y la del *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB). Una vez asignadas las señales más relevantes se realiza una integración de los espectros de RMN. El objetivo de este análisis es cuantificar los metabolitos más abundantes.

#### 4.4. *Análisis estadístico multivariante.*

Todas las técnicas utilizadas dan lugar a un conjunto de resultados complejo que requiere programas informáticos específicos para su visualización y métodos quimiométricos y bioinformáticos para su análisis estadístico. Esto es crucial para identificar y validar estadísticamente las sustancias que contribuyen a la clasificación o al diagnóstico, ya que ellas conforman un conjunto complejo de biomarcadores que puede ayudar a definir el contexto biológico o clínico y explicar los mecanismos bioquímicos relacionados con los cambios observados (Nicholson *et al.*, 2007).

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es un método estadístico no supervisado que no requiere conocimiento previo de las muestras, ello resulta muy útil para identificar patrones o tendencias dentro de los grupos de muestras. Este método, se basa en la reducción de la dimensionalidad de los datos de forma que todas las variaciones quedan agrupadas en diferentes componentes (primero, segundo, tercero etc.), según su importancia en la interpretación de la variable observada (Halouska y Powers, 2006).

#### 4.5. *Interpretación biológica.*

La última etapa en un estudio de Metabolómica consiste en la interpretación biológica de las variaciones encontradas entre los distintos perfiles metabólicos. Existen diversas bases de datos con información sobre rutas metabólicas relevantes, en las que se detallan los metabolitos que intervienen en ellas. De forma complementaria, es necesaria la búsqueda en la literatura de información relacionada que permita situar los metabolitos encontrados en el contexto adecuado.

## 5. Modelos animales en experimentación.

Uno de las etapas limitantes en el ámbito de la investigación biomédica es el traspaso de los estudios preclínicos a los clínicos. Los estudios usando células aisladas o tejidos son de gran utilidad y proporcionan información relevante. Sin embargo, los investigadores necesitan analizar la respuesta y efectividad de un fármaco analizando un sistema biológico vivo (Vandamme, 2015). De igual manera, los animales modelo ofrecen ventajas de tipo práctico para el investigador como el suministro prácticamente ilimitado y la facilidad de manipulación. Las principales especies utilizadas como animales modelos se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Principales animales modelo utilizados en investigación y sus aplicaciones más importantes.**

<b>Organismo modelo</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Aplicaciones</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	Estudios de procesos biológicos y celulares y de interacción
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca del vinagre	Mapeo genético, estudios de ligamiento y recombinación, búsqueda de mutantes, identificación de genes
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Gusano	Genética del desarrollo y envejecimiento
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Estudios de mapeo e identificación de genes relacionados en el desarrollo de órganos
<i>Mus musculus</i>	Ratón	Bases genéticas de enfermedades humanas.

El ratón de laboratorio está considerado como el primer organismo modelo de elección para el estudio de enfermedades en humanos. Esto es debido a que comparte con el humano alrededor del 99 % de sus genes, así como la mayoría de características fisiológicas y patológicas. Asimismo, la gran cantidad de información extraída a partir de estudios de genómica comparativa entre ratones y humanos ha permitido el desarrollo de nuevos modelos para enfermedades específicas (Rosenthal y Brown, 2007).

Existen numerosos estudios en los que se han analizado los perfiles metabólicos de órganos del modelo ratón por RMN para la investigación de enfermedades. Por ejemplo, se han obtenido resultados interesantes en estudios de corazón (Menazza *et al.*, 2013; Mayr *et al.*, 2013), cerebro (Fauvelle *et al.*, 2012; Salek *et al.*, 2010) y pulmón (Hu *et al.*, 2008) Esto demuestra el gran potencial que tiene la Metabolómica en el estudio y caracterización metabólica de diferentes tipos de enfermedades, así como un mayor uso de la espectroscopia de RMN en este campo. Hay que remarcar, sin

embargo, que todavía hay algunos órganos de ratón (piel, ojos, timo, estómago, útero, etc.), donde el potencial de la Metabolómica para el diagnóstico de enfermedades, estudios de su mecanismo y predicción de respuesta a un tratamiento todavía no se ha explotado.

## 6. Diabetes mellitus.

La DM es un desorden metabólico que resulta de defectos en la secreción de insulina, su acción o ambos (Bastaki, 2005). La principal acción de la insulina es promover el consumo de glucosa en el músculo esquelético y suprimir la producción de glucosa en el hígado, manteniendo la homeostasis de glucosa. Este tipo de defectos conducen al desarrollo de hiperglicemia crónica con desequilibrios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Si la enfermedad avanza sin tratamiento, el paciente puede desarrollar complicaciones tales como retinopatía, neuropatía, nefropatía y complicaciones cardiovasculares (Bastaki, 2005). Los síntomas más comunes son poliuria, polidipsia, pérdida de peso de causa inexplicable, etc., así como una concentración de glucosa en plasma elevada. La mayoría de casos de DM pueden clasificarse en dos categorías: DM tipo I y DM tipo II.

### 6.1. *Diabetes mellitus tipo I.*

Esta enfermedad se caracteriza por tener un fuerte componente genético, heredado principalmente mediante el complejo HLA. No obstante, los factores que disparan la aparición de los síntomas clínicos no han sido completamente descifrados). El resultado de este desorden genético es proceso de destrucción celular autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. Esta forma de DM cuenta con una incidencia aproximada del 5-10 %, mucho más reducida que la correspondiente a la DM tipo 2 (Daneman, 2006).

### 6.2. *Diabetes mellitus tipo II.*

La forma predominante de DM es la DM tipo II, que representa aproximadamente el 90% de todos los casos de DM. Las principales características que definen patológicamente la DM tipo II son una deficiencia en la secreción de insulina y la resistencia a insulina en tejidos diana. La resistencia a insulina se define como una reducida sensibilidad a sus acciones metabólicas de dicha hormona (Hameed *et al.*, 2015). Entre los factores de riesgo más relevantes para la DM tipo II se encuentran

factores genéticos, ambientales y metabólicos. De hecho, aquellos individuos que presenten obesidad, inactividad física y antecedentes familiares tienen un alto riesgo de padecer DM tipo II (Fletcher *et al.*, 2002).

### 6.3. *Complicaciones que afectan al sistema visual: retinopatía diabética.*

La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones más prevalentes y comunes de la DM, así como una de las principales causas de ceguera en países desarrollados. Si bien es conocido que esta complicación causa perturbaciones en todos los componentes del tejido de la retina, su diagnóstico aún depende de la detección de daños asociados al tejido vascular (Eisma *et al.*, 2015).

En pacientes con DM, la hiperglicemia resulta en derrames vasculares causando edema macular por un lado y oclusión capilar por otro lado. Recientes investigaciones demuestran que todo el sistema neurovascular de la retina se ve afectado por la DM, resultando en neurodegeneración y neuroinflamación, que puede ser detectada incluso antes del daño vascular (Abcouwer y Gardner, 2014). Alteraciones bioquímicas como el estrés oxidativo, la activación de proteína quinasa C y la glicación de productos finales del metabolismo han sido detectados como respuesta de la retina a la hiperglicemia (Ahsan, 2015). Existen algunos estudios preliminares (Barba *et al.*, 2010) sobre RD, sin embargo de momento no se ha llevado ningún estudio metabólico en ojos completos de modelos animales.

### 6.4. *Modelos animales para el estudio de diabetes mellitus tipo II.*

En modelos animales, la DM puede inducirse mediante productos químicos como el aloxano, por extirpación quirúrgica del páncreas, por selección de mutantes o mediante manipulación genética. El estudio de las distintas rutas moleculares relacionadas con la RD ha mejorado mucho gracias al desarrollo de modelos basados en la transgénesis y la tecnología *knock-out*. Un animal *knock-out* es producido usando una construcción genética que interrumpa un gen normal (Robinson *et al.*, 2012). Un modelo de interés para el estudio de DM son los ratones *knock-out* IRS2, empleados en el presente trabajo. La IRS2 forma parte de una familia de proteínas llamadas sustratos del receptor de insulina. Permiten la transducción de señales de la insulina y el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1). Este tipo de ratones presentan las alteraciones características de la DM y son apropiados para el estudio de la RD ya que IRS2 promueve el desarrollo y maduración de los fotorreceptores (Yi *et al.*, 2005).

## II. OBJETIVOS

Si bien se puede encontrar en la bibliografía la asignación y cuantificación de perfiles metabólicos por RMN de una serie de órganos y tejidos de ratón, sólo existe una exhaustiva base de datos con información metabólica para múltiples tejidos de ratón basada en la espectrometría de masas. Concretamente, se encuentra una falta de información metabólica sobre una serie de órganos con interés preclínico como son ojo, timo, tráquea, vesícula o piel, sí estudiados mediante otras técnicas analíticas.

Por otro lado, el mecanismo de la retinopatía diabética, una complicación de la diabetes mellitus que afecta a un elevado número de pacientes en países desarrollados no se conoce en detalle ni existe un tratamiento eficaz en estadios tempranos. Una estrategia interesante para avanzar en esta problemática, no implementada hasta ahora, sería el análisis de perfiles metabólicos de los ojos de animales modelo afectados.

En este contexto, los objetivos del presente trabajo son:

1. Elaborar un perfil metabólico exhaustivo de los siguientes órganos del modelo ratón: ojo, timo, tráquea, vesícula, pulmón y piel.
  - 1.1. Obtener extractos de los seis órganos citados y analizarlos por RMN de alta resolución.
  - 1.2. Preparar muestras intactas de los seis órganos citados y analizarlas por HRMAS.
  - 1.3. Asignar y cuantificar los metabolitos en los espectros.
2. Comparar los espectros obtenidos a partir de extractos y de tejido intacto y los perfiles metabólicos de los diferentes órganos.
3. Realizar un estudio metabolómico de ojo en modelos animales de diabetes mellitus aplicado a la retinopatía diabética.
  - 3.1. Analizar y comparar el perfil metabólico de ojos de ratón sanos y *knock-out* IRS2.
  - 3.2. Identificar posibles biomarcadores relacionados con la retinopatía diabética.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material biológico.

El estudio de la asignación de metabolitos se llevó a cabo con órganos de ratón control cedidos por laboratorio de la Dra. María Jesús Vicent del CIPF, concretamente ratones IBalb/c que se compraron en Laboratorios Harlan (España). Se realizó el análisis metabolómico de seis órganos de ratón: ojos, timo, vesícula, piel, pulmón y tráquea. Para la realización de los experimentos monodimensionales se tomaron cuatro réplicas biológicas de cada órgano; dos de ellas proviniendo de un ratón macho y las otras dos restantes proviniendo de un ratón hembra. Para realizar los experimentos bidimensionales y el experimento monodimensional correspondiente, se preparó una quinta muestra concentrada a partir de las cuatro iniciales. Para la realización de los experimentos de HRMAS se tomaron fragmentos de tres órganos distintos que se introdujeron en el rotor de HRMAS para la adquisición de los espectros.

Para el estudio metabolómico de aplicación a enfermedad se utilizaron ojos de ratón *knock-out* para IRS2 cedidos por el laboratorio del Dr. Luke Noon del CIPF, concretamente ratones B6;129-*Irs2*<sup>tm1Mfw</sup>/J que se compraron en The Jackson Laboratory (USA). Para la realización de los experimentos monodimensionales se tomaron seis pares de ojos de ratones *wild type* o sanos (WT) y ratones *knock-out* IRS2 (KO). Los ratones del grupo KO fueron sacrificados a las ocho semanas, cuando la concentración de glucosa en sangre y el peso fueron superiores que en los ratones WT.

#### 2. Extracción de metabolitos.

Se realizó según el protocolo de extracción con metanol/cloroformo/agua. Este método ha demostrado ser rápido y sencillo, permitiendo extraer y cuantificar metabolitos tanto polares como apolares (Beckonert *et al.*, 2007). Las muestras fueron inicialmente trituradas usando nitrógeno líquido y un mortero. El triturado fue transferido a un tubo Eppendorf y mantenidos en hielo. Para la extracción se añadieron en primer lugar 160 µL de metanol y 80 µL de cloroformo. Se homogeneizó con vortex y se aplicaron tres ciclos de congelación/descongelación. A continuación, se añadieron 125 µL de cloroformo y 125 µL de agua Milli-Q. Seguidamente se homogeneizó con vortex y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos. En este punto se obtuvieron dos fases: una fase acuosa en la parte superior del tubo que se corresponde con el extracto de los metabolitos polares (metanol/agua) y una fase orgánica en la parte inferior del tubo que

se corresponde con el extracto de los metabolitos apolares (cloroformo). Una vez separadas ambas fases y transferidas a tubos diferentes, se liofilizó la fase acuosa y se evaporó con el concentrador a vacío la fase orgánica. Los extractos secos se conservaron a -80 °C.

### **3. Preparación de muestras para RMN.**

Los extractos de la fase acuosa fueron resuspendidos en 550 µL de tampón de RMN (100 mM de tampón fosfato, en D<sub>2</sub>O, pH 7,4, 0,1 mM de TSP). El extracto resuspendido fue pasado por vortex y transferido a un tubo de RMN. Los extractos de la fase orgánica fueron resuspendidos en 600 µL de cloroformo deuterado con 0,03% v/v de TMS, administrado usando una jeringuilla Hamilton a partir de una ampolla individual. El extracto resuspendido fue pasado por vortex y transferido a un tubo de RMN. Los tubos correspondientes a la fase orgánica fueron sellados. Todas las muestras fueron preparadas el mismo día de la medida y almacenadas a 4 °C hasta aproximadamente 20 min antes de ser medidas.

Las muestras de tejido intacto no requirieron la etapa de extracción de metabolitos y fueron preparadas introduciendo directamente un fragmento del tejido a analizar en un rotor de HRMAS de 30 µL desechables, juntamente con 10 µl de tampón RMN. Los rotores se conservaron a -80 °C hasta la medida. Justo antes de la medida, el rotor desechable atemperado se introdujo en un rotor convencional de 50 µL.

### **4. Espectroscopia de RMN.**

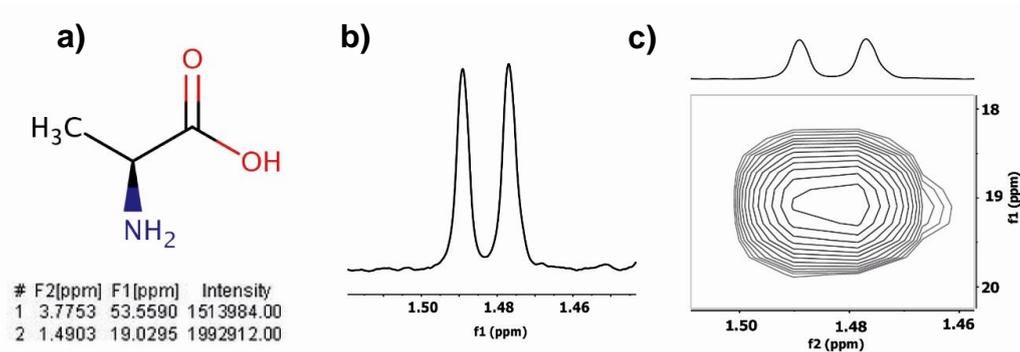
Los espectros de RMN de los extractos acuosos se adquirieron a 27 °C en un espectrómetro Bruker AvII-600 usando una criosonda TCI de 5 mm. Los espectros de fase orgánica se adquirieron a 27 °C en un espectrómetro Bruker AvIII-500 con sonda TBI de 5 mm. Los espectros de tejido intacto se realizaron a 4 °C en un espectrómetro Bruker AvIII-500 usando una sonda de HRMAS de 5 mm con rotación de 3.500 Hz

Los espectros monodimensionales se realizaron con 256 *Free Induction Decays* (FID) para la fase orgánica y 128 FIDs para la fase acuosa y las muestras de tejido intacto. La amplitud espectral para los extractos de fase acuosa se estableció en 30 ppm; la amplitud espectral para los extractos de fase orgánica se estableció en 20 ppm; la amplitud espectral para las muestras de tejido intacto es estableció en 14 ppm. Se incluyó un intervalo de relajación de 3 segundos entre FIDs y se aplicó una presaturación de la señal del agua para muestras de fase acuosa. A la FID resultante se le aplicó la

transformada de Fourier, multiplicando por una función exponencial de 0,5 Hz para los extractos y de 1 Hz para tejido intacto. Los experimentos bidimensionales TOCSY y HSQC se llevaron a cabo sólo para las muestras concentradas. Los retardos de relajación se establecieron a 1,5 s y los experimentos se adquirieron en el modo sensible a la fase. Para los extractos, los espectros TOCSY se realizaron usando una secuencia de pulsos estándar MLEV-17 con tiempos de mezclado de 65 ms. Para los tejidos intactos, el TOCSY se adquirió con una modulación de frecuencia tangencial, empleando una longitud de 285  $\mu$ s para el pulso adiabático y un tiempo de mezcla de 60 ms.

### 5. Asignación y cuantificación de metabolitos e identificación.

La asignación de señales e identificación de metabolitos se realizó con la ayuda de la base de datos HMDB y utilizando los espectros bidimensionales obtenidos. En la Figura 2 se representa la secuencia de eventos a seguir para asignar una señal en un espectro.



**Figura 2. a) Estructura química de la alanina. b) Señal del protón -CH<sub>3</sub> de la alanina en un espectro monodimensional. c) Señal del protón -CH<sub>3</sub> de la alanina en un espectro bidimensional (HSQC).**

En primer lugar, se debe buscar información en las bases de datos sobre la estructura química de los metabolitos. De esta forma, se puede analizar y comprender el entorno químico de los protones resonantes, prediciendo así la forma de su señal correspondiente. La Figura 2.a muestra la estructura química del aminoácido alanina así como el desplazamiento químico a los que resuenan los protones de sus grupos CH y CH<sub>3</sub> respectivamente. La señal del protón del grupo CH<sub>3</sub> de la alanina es más intensa que la del protón del grupo CH ya que tiene tres hidrógenos. Debido a que el grupo CH tiene un hidrógeno, se puede predecir la forma de la señal resultante mediante la regla de  $n + 1$ . La señal que generan los protones del grupo CH<sub>3</sub> se mostrará como un doblete.

En segundo lugar, se debe identificar la señal predicha en el espectro monodimensional que se está asignando. La Figura 2.b muestra la señal a 1,49 ppm correspondiente al protón del grupo CH<sub>3</sub> de la alanina obtenido a partir de una muestra de ojos de ratón durante el desarrollo de este trabajo.

Una vez se haya identificado la señal correspondiente al protón de un metabolito concreto, se procede a confirmar esta asignación. Para ello se recurre al espectro bidimensional HSQC. La Figura 2.c representa la señal en el espectro bidimensional correspondiente al protón del grupo CH<sub>3</sub> de la alanina obtenido a partir de una muestra de ojos. Se observa que el carbono correspondiente al doblete a 1,49 ppm se sitúa a 19 ppm, lo que es coherente con la predicción observada en la base de datos.

Para la cuantificación de los metabolitos identificados, los espectros fueron integrados con MestreNova. Para facilitar la comparación entre muestras, los valores obtenidos en la integración fueron normalizados al área total para minimizar la variabilidad generada en el proceso de extracción.

En el caso del estudio metabolómico sobre la RD, se realizó un test estadístico t-Student para validar la significación estadística de las diferencias obtenidas entre los grupos de ratones control y *knock-out*.

## **6. Análisis estadístico multivariante.**

Se realizó un análisis estadístico multivariante. Para ello se utilizó el programa SIMCA-P 12.0 introduciendo los valores de integración normalizados de los metabolitos. Para facilitar la interpretación de los datos se aplicó un escalado a varianza unitaria. Se llevó a cabo un PCA y se evaluaron los parámetros R<sup>2</sup> (bondad de ajuste) y Q<sup>2</sup> (bondad de predicción) para asegurar la fiabilidad del modelo. A partir del modelo PCA se pueden obtener dos tipos de gráficos que permiten la interpretación biológica de los resultados.

El primero de ellos es el *Score Plot*, un gráfico en dos o más dimensiones de los componentes principales más significativos del modelo en el que cada punto representa el espectro de una única muestra. Este gráfico permite ver la variabilidad entre muestras e identificar agrupamientos según la similitud metabólica entre muestras. El segundo de ellos es el *Loading Plot* en el que están representados los metabolitos que participan en la diferenciación de clases observadas en el *Score Plot*.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.a. Resultados y discusión. Parte 1.

En la primera parte del trabajo se obtuvo y analizó el perfil metabólico de seis órganos diferentes de ratón: ojos, timo, tráquea, pulmón, piel y vesícula. Existe una exhaustiva base de datos con información de metabolitos de tejidos de ratón basada en espectroscopia de masas (Sugimoto *et al.*, 2012) y se puede encontrar información relevante sobre timo y pulmón. De pulmón también es posible encontrar información metabólica basada en experimentos de RMN de alta resolución (Ji-Hyun *et al.*, 2011) y de HRMAS (Rocha *et al.*, 2009).

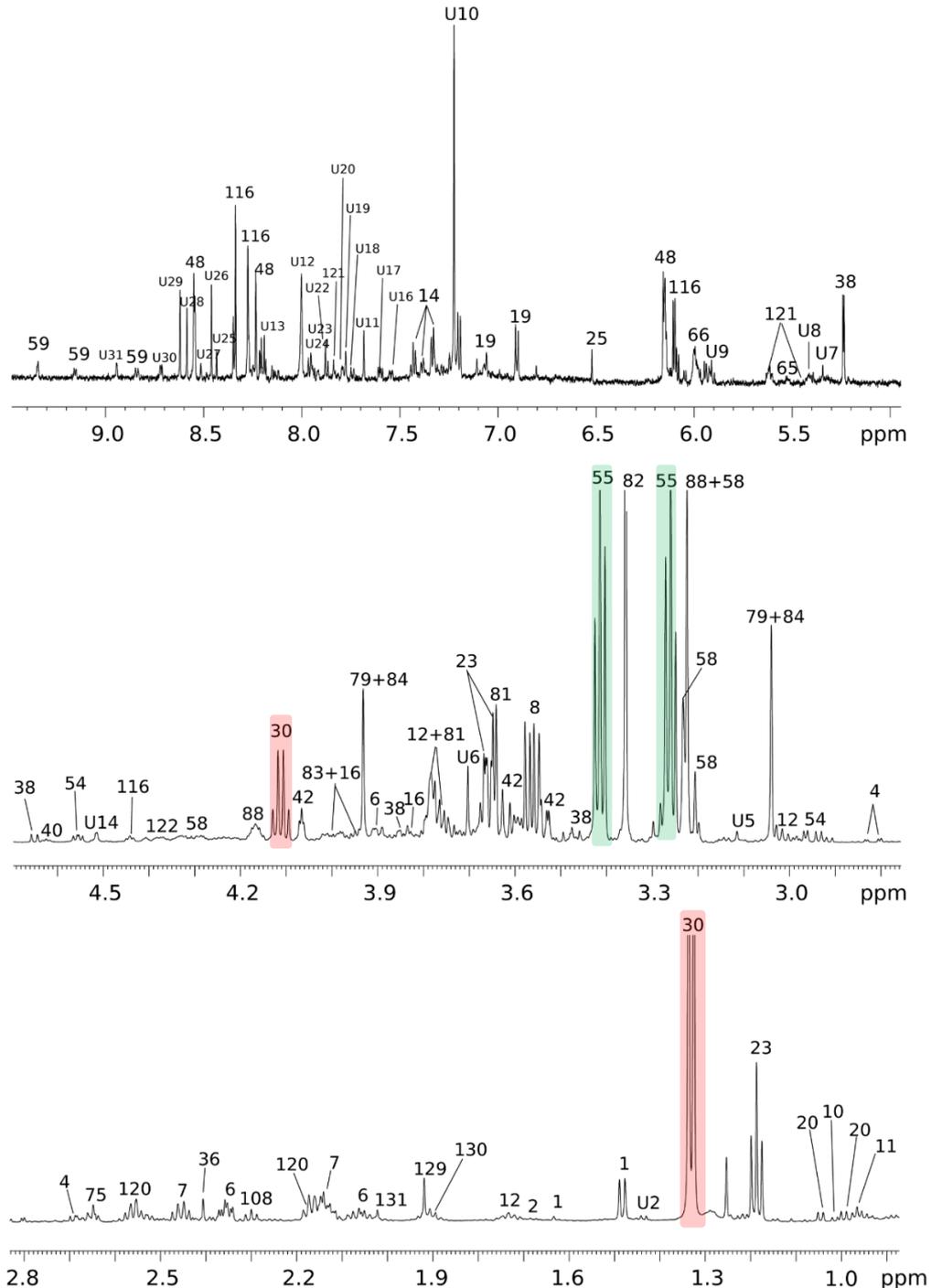
En relación al resto de órganos, la información existente sobre perfiles metabólicos por RMN es escasa. Con respecto al perfil de ojos, se pueden encontrar datos sobre análisis mediante *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) (Alper *et al.*, 1986) y se han publicado los metabolitos encontrados en diversas fracciones de tejido del ojo humano analizadas mediante HRMAS (Kryczka *et al.*, 2014). También timo (Hasegawa *et al.*, 2015) y tráquea (Carlson *et al.*, 2010) fueron analizados mediante MRI. En el caso de timo, se puede encontrar un estudio de extractos lipídicos de este órgano en ratón mediante RMN de alta resolución (Pinal-Fernández *et al.*, 2011), igual que para los lípidos de la piel de ratón (Khandelwal *et al.*, 2014). En cuanto a vesícula, se pueden encontrar un estudio del perfil de lípidos por RMN de alta resolución (Jayalakshmi *et al.*, 2011), así como un análisis por HRMAS de dicho órgano (Bharti *et al.*, 2013). Con respecto al análisis de metabolitos polares a partir de extractos acuosos mediante RMN de alta resolución, la información existente en la literatura es escasa.

Para el desarrollo del presente trabajo y debido a las limitaciones de espacio del mismo, se decidió describir de forma detallada la asignación de metabolitos identificados en ojos, debido a su interés para el estudio metabólico aplicado a la RD. A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de ojos.

#### **1. Asignación de señales e identificación de metabolitos en ojos.**

En la Figura 3 se muestra el espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN del extracto correspondiente a la fase acuosa del ojo. Como puede observarse en la Figura 3, el espectro completo fue dividido en tres regiones para facilitar su interpretación y análisis. Se pueden apreciar una gran cantidad de señales bien resueltas y poco solapadas permitiendo la identificación de un amplio rango de metabolitos. Para la obtención de este espectro se

utilizó una sonda fría o criosonda que aumenta notablemente la sensibilidad del espectroscopio de RMN. Como resultado, se obtuvo un espectro de gran calidad en el que fue posible identificar metabolitos minoritarios como el Adenosín Trifosfato (ATP) o la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidrogenado (NADH).

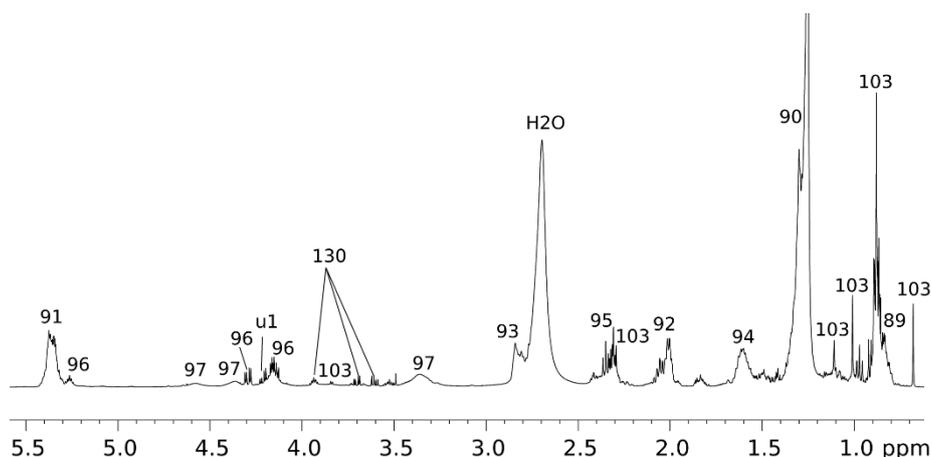


**Figura 3.** Espectro  $1\text{D } ^1\text{H}$  RMN de la fase acuosa de ojo adquirido con un espectrómetro de 600 MHz a 27 °C. En rojo: señales correspondientes a lactato. En verde: señales correspondientes a taurina.

A partir del espectro obtenido se consiguió asignar prácticamente todas las señales relevantes, correspondiendo a un total de 36 metabolitos polares diferentes. Las asignaciones están indicadas en la Figura 3 mediante números. Los metabolitos que corresponden a esta numeración se pueden consultar en el Anexo I, así como la clasificación seguida, que puede consultarse en el Anexo II. De igual manera el espectro bidimensional empleado para confirmar la asignación puede consultarse en el Anexo III.

Entre los metabolitos identificados se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y nucleótidos. Los metabolitos más abundantes identificados fueron taurina (55 según numeración en Anexo I) y lactato (30 según numeración en Anexo I). La taurina presenta dos señales. La primera de ellas corresponde con un triplete a 3,25 ppm y la segunda corresponde de nuevo con un triplete a un desplazamiento químico de 3,42 ppm. El lactato presenta una señal que corresponde con un doblete a 1,32 ppm y una segunda señal que corresponde con un cuadruplete a 4,10 ppm.

Una vez asignados los metabolitos polares en el ojo, se procedió al análisis del espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN correspondiente a la fase orgánica del extracto, presentado en la Figura 4. Se aprecian diferencias entre el espectro de fase acuosa y el espectro de fase orgánica.



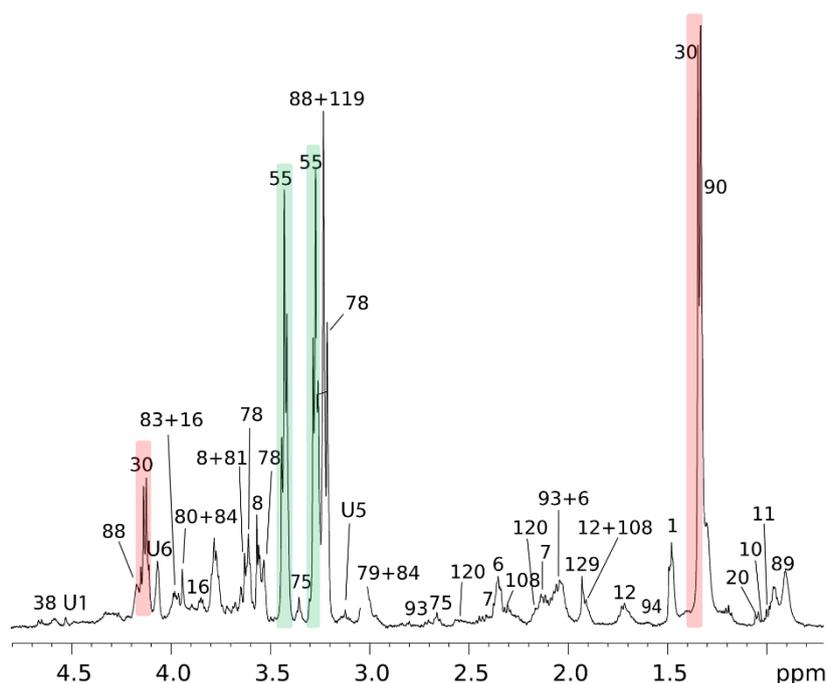
**Figura 4. Espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN de la fase orgánica de ojo adquirido en un espectrómetro de 500 MHz a 27 °C.**

Como se observa en la Figura 4, las señales correspondientes a los metabolitos apolares son más anchas. Una elevada proporción de estos metabolitos son de tipo lipídico. Este tipo de moléculas se caracterizan por presentar una larga cadena hidrocarbonada, de manera hay gran número de señales de protón por cada metabolito. Las señales de estos hidrógenos tienden a solaparse haciendo que aumente el grosor de las señales presentes en el espectro. Asimismo, destaca la presencia de una señal de agua en el espectro que proviene de una fracción de agua que no fue correctamente

evaporada en el proceso de extracción. En ocasiones, señales de agua muy anchas pueden solapar otras señales de interés dificultando la identificación de metabolitos.

En este tipo de espectros la identificación de lípidos o ácidos grasos concretos es muy compleja debido al elevado número de hidrógenos químicamente iguales que presentan las moléculas. Por ello, aquí la identificación de metabolitos se basa principalmente en la identificación de grupos funcionales. A partir del espectro presentado en la Figura 4, se consiguió identificar un total de 10 grupos funcionales de metabolitos apolares diferentes. Entre los metabolitos identificados destacan grupos específicos de fosfolípidos, colesterol y lípidos tanto saturados como insaturados. En el Anexo IV puede consultarse el espectro bidimensional utilizado para confirmar la asignación.

Finalmente, se procedió al análisis del espectro de HRMAS de ojos, que queda presentado en la Figura 5. Para la obtención de este tipo de espectro se utilizó el órgano completo, de manera que no se analizaron fase acuosa y fase orgánica por separado. De esta manera, en la Figura 5 se pueden identificar tanto metabolitos polares como apolares.



**Figura 5. Espectro 1D  $^1\text{H}$  HRMAS de ojo intacto adquirido con un espectrómetro de 500 MHz a 4 °C. En rojo: señales correspondientes a lactato. En verde: señales correspondientes a taurina.**

Como se observa en la Figura 5, se pueden identificar un mayor número de señales solapadas que en los espectros obtenidos para fase acuosa y fase orgánica. Esto se debe a la presencia de señales de lípidos en el espectro que debido su forma

pueden tapar otras señales más pequeñas. No obstante, para la obtención de este espectro se utilizó una secuencia de pulsos CPMG que actúa filtrando las señales pertenecientes a moléculas de elevado peso molecular. De esta manera, es posible visualizar señales de metabolitos pequeños que pueden aparecer solapadas por lípidos.

Asimismo, los espectros de tejido intacto tienen menor resolución que los espectros de extracto. Como se expuso anteriormente, la taurina da dos señales en el espectro de protón. Estas dos señales se corresponden a dos tripletes, el primero de ellos a 3,25 ppm y el segundo a 3,42 ppm. Como se observa en la Figura 5, ambas señales se pudieron asignar y por tanto se confirmó la presencia de taurina en la muestra. Sin embargo, las señales no aparecieron bien resueltas en el espectro, es decir, no se pudo comprobar que la señal se correspondía con un triplete. De igual manera ocurre con el lactato. Fue posible asignar sus dos señales características pero el espectro no tiene la resolución suficiente como para identificar la forma de dichas señales.

Los metabolitos polares identificados en los espectros de ojos son coherentes con la información encontrada en la literatura sobre diferentes tejidos de ojos (Kryczka *et al*, 2014). Al igual que en nuestros resultados, el lactato, la taurina, la alanina, la creatina y la fosfocreatina presentaron señales muy intensas. Los autores destacan la señal correspondiente al grupo metilo del lactato, que aparece a 1,32 ppm, como la más intensa en todos los espectros. Efectivamente, dicha señal aparece muy intensa en los resultados obtenidos en el presente trabajo, pero debemos tener en cuenta que las señales de taurina a 3,25 ppm y 3,42 ppm aparecen más intensas y junto con la señal de lactato dominan el espectro. Otros metabolitos presentes y que son consistentes con la información consultada fueron: ATP, fenilalanina, glutatión, hipotaurina, leucina, isoleucina o valina, así como con las señales representativas de la glucosa. En el Anexo V puede consultarse el espectro bidimensional utilizado para confirmar la asignación.

## **2. Comparación de perfiles de extractos y de tejido intacto.**

Tal como se ha visto en el análisis anterior, los metabolitos de un órgano se pueden cuantificar por dos métodos: a partir de un extracto o a partir de trozo de tejido intacto. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas. En la Figura 6 se muestra una comparación de los tres espectros obtenidos del ojo: el correspondiente a la fase acuosa del extracto, el correspondiente al de la fase orgánica del extracto y el correspondiente a tejido intacto.

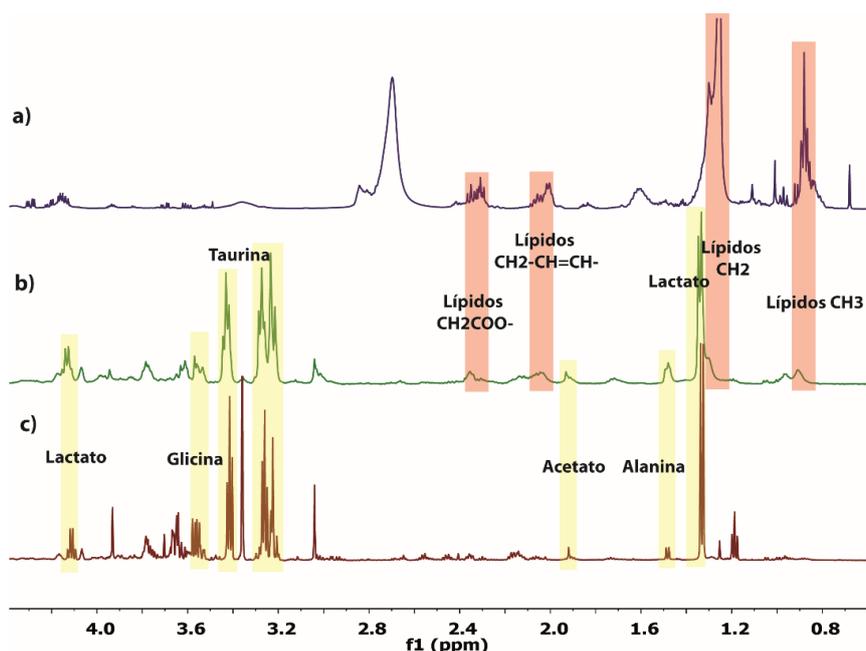


Figura 6. Comparación de espectros según su fase y HRMAS. a) Fase orgánica. b) HRMAS. c) Fase acuosa.

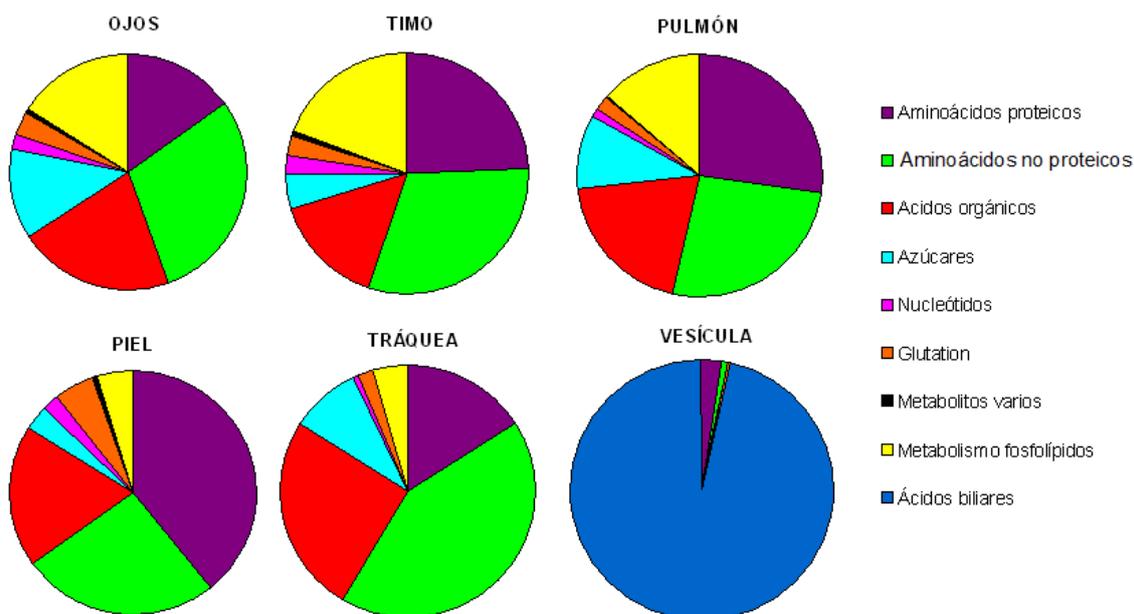
Tal como se observa en la Figura 6.b., en un espectro de HRMAS podemos encontrar señales de metabolitos tanto polares como apolares. Se puede identificar las señales correspondientes a lactato y acetato, que son dos ácidos orgánicos de naturaleza polar. Se observa que dichas señales no aparecen en la Figura 6.a. pero sí en la Figura 6.c. de igual manera ocurre con metabolitos de naturaleza apolar como el colesterol, que sólo está presente en las Figuras 6.a. y 6.b. En HRMAS se observan los lípidos más móviles de manera que se reduce la interferencia de lípidos de membrana. Asimismo, se evita el proceso de extracción de metabolitos, reduciendo el tiempo de preparación de muestra y disminuyendo la parte de la variabilidad debida a los errores experimentales. Además el mismo trozo tejido puede ser empleado después para posteriores análisis histológicos, Western Blot o amplificación.

Por otro lado, los espectros de los extractos muestran una mayor resolución y sensibilidad. Con respecto al espectro de fase acuosa, esta mayor sensibilidad es debida a la criosonda. En los espectros de extractos se produce un menor solapamiento de señales de manera que no es necesario trabajar con filtros de relajación. Pero ello, se puede cuantificar un mayor número de metabolitos. Por el contrario, si la proporción de metabolitos apolares es muy elevada, pueden darse solapamientos en el espectro de HRMAS para metabolitos determinados, tal y como se observa en la Figura 6 que ocurre con la señal de lactato y de lípidos CH<sub>2</sub>.

Debido a la extensión total del trabajo, no es posible presentar de forma detallada los espectros correspondientes a piel, tráquea, pulmón, timo y vesícula, pero, los espectros correspondientes a la asignación completa de estos de órganos pueden consultarse en los Anexos VI - XXVI. Cabe destacar que se consiguió identificar un total de 46 metabolitos en piel, 49 metabolitos en tráquea, 47 metabolitos en pulmón y 46 metabolitos en timo, contando metabolitos polares y apolares. En la vesícula principalmente se identificaron las señales correspondientes a ácidos biliares.

### 3. Análisis y comparación de perfiles metabólicos de diferentes órganos.

Después de la asignación de los metabolitos en los espectros, se procedió a la cuantificación de los mismos, utilizando las regiones de integración recogidas en los Anexos XXVII – XXXII. A partir de estos datos, se obtuvieron los perfiles metabólicos de cada órgano, realizando una comparación de la cantidad y el tipo de metabolitos presentes en cada uno. La finalidad de este análisis fue ver si dichos perfiles obtenidos por RMN variaban entre órganos y reflejaban la estructura histológica y/o funcional de los órganos. En un primer análisis más general, se comparó el porcentaje de los diferentes tipos de metabolitos presentes. En el caso de la fase acuosa, estos se agruparon en nueve grupos siguiendo los criterios de clasificación de la base de datos HMDB. En la Figura 7 se recogen los perfiles metabólicos, correspondientes a los metabolitos polares, de los órganos analizados.



**Figura 7. Contribución de cada grupo de metabolitos polares a la composición del perfil metabólico de cada órgano en el extracto de fase acuosa.**

Tal como se refleja en la Figura 7, la vesícula biliar, un saco muscular que recibe y almacena la bilis hasta que es estimulada para liberarla (Megías *et al.*, 2015), se puede distinguir claramente del resto de órganos debido a la elevada proporción de ácidos biliares que presenta, de los cuales se consiguió identificar de forma inequívoca el ácido taurodeoxicólico y el ácido glicocólico. Se puede identificar una fracción de aminoácidos en su perfil metabólico, que en gran parte se podrá deber al hecho de que los aminoácidos pueden formar conjugados de mayor solubilidad con los ácidos biliares. Los ácidos biliares dificultan la identificación y cuantificación del resto de metabolitos, por lo que no se tuvo en cuenta la vesícula para futuras comparaciones.

Los perfiles metabólicos de ojos, timo, pulmón, piel y tráquea se muestran más uniformes entre sí, presentando todos los grupos de metabolitos identificados. El grupo de compuestos que más destaca en estos órganos es el formado por aminoácidos, comprendiendo aminoácidos proteicos y no proteicos. Los metabolitos que más contribuyen en el grupo aminoácidos no proteicos son la taurina, la creatina y la fosfocreatina. Los aminoácidos juegan un papel fundamental en el metabolismo. Además de ser los componentes de las proteínas, los aminoácidos son moléculas muy versátiles bioquímicamente y sirven como punto de partida para la síntesis de moléculas nitrogenadas y de péptidos de gran interés fisiológico.

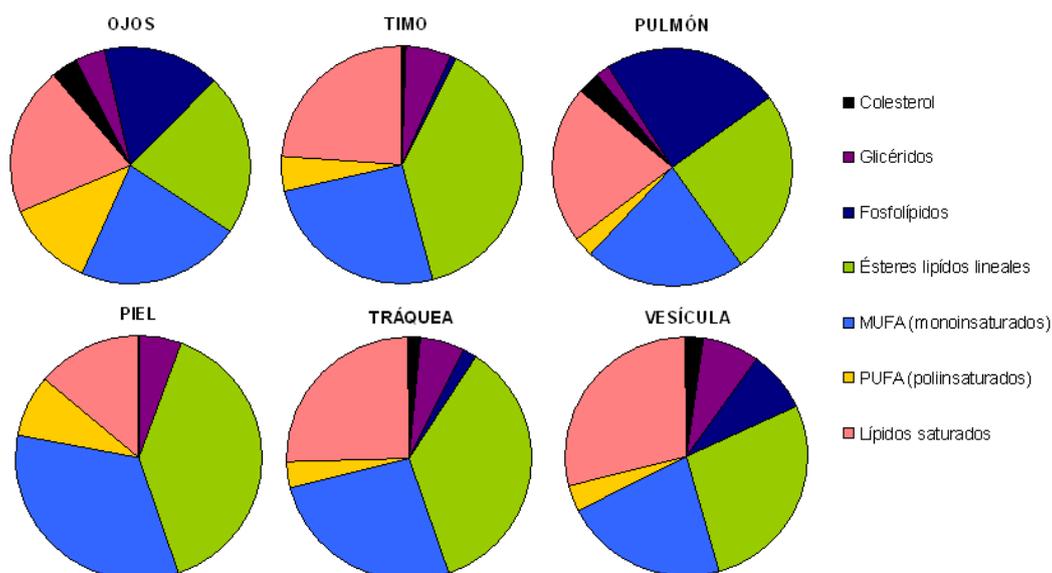
La tráquea es un órgano que presenta una mucosa de tejido epitelial interna, una submucosa, una capa importante de cartílago con músculo liso y una capa adventicia de tejido conectivo que puede presentar tejido adiposo. El pulmón presenta estructuras como los bronquios y bronquiolos, de estructura similar a la tráquea aunque desaparece el cartílago a medida que se van ramificando y la capa de músculo liso es más patente (Megías *et al.*, 2015). Como se observa en la figura, ambos órganos presentan una elevada proporción de aminoácidos, resultado coherente con el hecho de que los dos contienen una parte importante de músculo. Por otro lado, uno de los principales componentes de los epitelios y del cartílago es el colágeno, una molécula de tipo proteico formada por aminoácidos. Asimismo, en la porción de aminoácidos no proteicos destaca la creatina y la fosfocreatina, sintetizadas a partir de aminoácidos proteicos y usadas en el músculo como reserva energética.

Como se muestra en la Figura 7, ojos, timo y pulmón parecen presentar una mayor similitud en la proporción de los grupos de metabolitos. Como diferencias entre ellos, se puede destacar una mayor contribución de aminoácidos no proteicos en ojos y una menor presencia de azúcares y timo. El ojo es una estructura redondeada que

presenta tejidos especializados en la captación de luz y el procesado de información sensorial. Entre el cristalino y la retina presenta una cavidad denominada cuerpo vítreo formada por una solución acuosa en la que abunda el colágeno y el hialuronato (Megías *et al.*, 2015). Como se comentó anteriormente, la presencia de aminoácidos libres es necesaria para la síntesis del colágeno y otras moléculas de tipo proteico que ayudan a conectar los tejidos.

La piel está compuesta por la epidermis de epitelio queratinizado, la dermis formada por tejido conectivo y la hipodermis formada principalmente por células adiposas. Como se observa en la Figura 7, el glutatión en piel destaca con respecto a otros órganos. La piel es el mayor órgano del cuerpo y está continuamente expuesta a radiaciones y xenobióticos que pueden aumentar la generación especies reactivas de oxígeno (ROS) en exceso. Por tanto, necesita de la presencia de un conjunto de antioxidantes que protejan las células de los efectos adversos de las ROS y, entre los antioxidantes más comunes en piel, están el glutatión, la glutatión peroxidasa y la glutatión S-Transferasa (Bickers y Athar, 2006). Asimismo, existen rutas relacionadas con estas moléculas cuya expresión se ve activada en situaciones de estrés oxidativo, como por ejemplo la activación del factor de transcripción Nrf2 (Soeur *et al.*, 2014).

Seguidamente, se llevó a cabo la cuantificación de los metabolitos asignados e identificados en los extractos de fase orgánica, utilizando las regiones de integración recogidas en el Anexo XXXIII. Con estos datos, se realizó una comparación de los perfiles metabólicos de la fase orgánica para cada órgano, que quedan recogidos en la Figura 8.



**Figura 8. Contribución de cada grupo de metabolitos apolares a la composición del perfil metabólico de cada órgano para su extracto de fase orgánica.**

Debido a la dificultad que presenta la identificación de metabolitos apolares concretos, las moléculas asignadas se agruparon según su naturaleza química. De esta forma los lípidos fueron clasificados en Ácidos Grasos Monoinsaturados (MUFA), Ácidos Grasos Poliinsaturados (PUFA), saturados y ésteres lipídicos lineales. Se distinguieron en un grupo a parte el conjunto de fosfolípidos, colesterol y glicéridos. El grupo de glicéridos comprende tanto triglicéridos como diglicéridos y monoglicéridos.

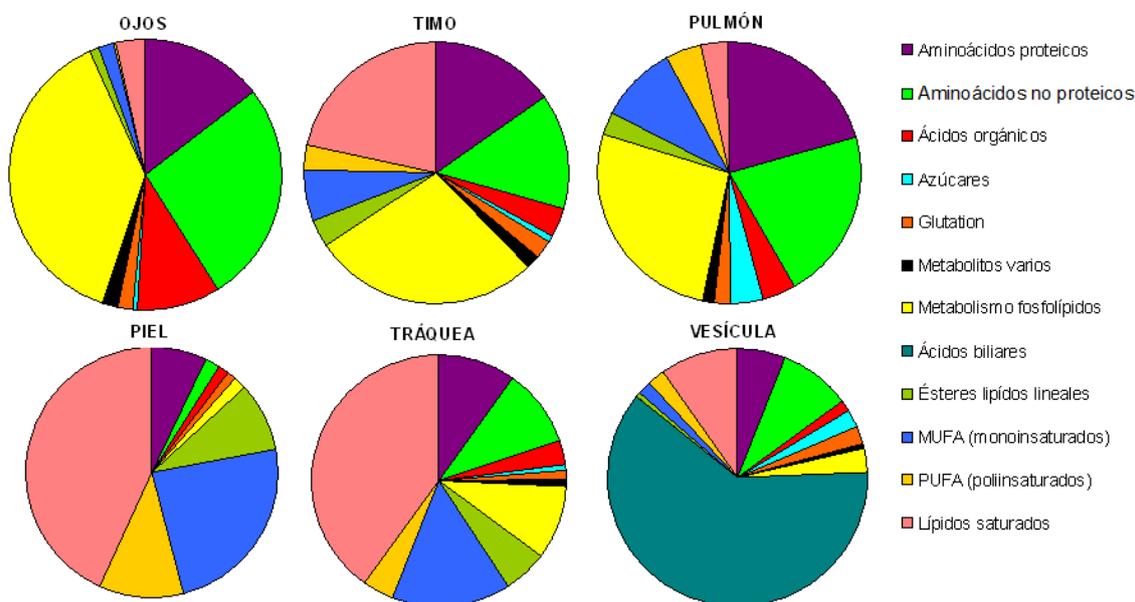
Como se muestra en la Figura 8, el perfil metabólico de la fase orgánica de vesícula, a diferencia de la fase acuosa, es parecido al de los otros órganos. Esto se debe a que los ácidos biliares no son solubles en cloroformo, y por lo tanto no quedan retenidos en la fase orgánica.

La presencia de este tipo de metabolitos es importante para la célula debido a que son componentes fundamentales de las membranas plasmáticas. En general, la porción de lípidos insaturados es mayor a los lípidos saturados. Dentro de los lípidos insaturados, la proporción de monoinsaturados es mayor que la de poliinsaturados. El órgano donde la proporción de lípidos monoinsaturados es mayor es piel. Además, piel y ojos destacan por tener una contribución en lípidos poliinsaturados ligeramente superior al resto de órganos. Una mayor proporción de lípidos insaturados permiten mantener las membranas fluidas a una menor temperatura, por lo tanto, es coherente que la piel, uno de los órganos más expuestos a bajas temperaturas, tenga una mayor proporción de ellos.

La proporción de colesterol, otro componente esencial de las membranas celulares que reduce la fluidez de éstas pero a elevadas concentraciones impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen (Alberts *et al.*, 2008), es variable y llega a ser muy baja en timo y no detectable en piel. En cuanto a la proporción de fosfolípidos, que permiten la interacción de múltiples proteínas con la membrana (Alberts *et al.*, 2008), es mayor en ojos y pulmón que en timo, piel y tráquea.

Por otro lado, un último tipo de lípido identificado es el formado por triglicéridos, que suelen acumularse en las células especializadas en forma de gránulos de lípidos o *lipid droplets*. Pueden considerarse orgánulos independientes ya que presentan una bicapa lipídica y su principal función es almacenar grasa (Alberts, *et al.*, 2008). Cabe destacar que la proporción de glicéridos es muy reducida en pulmón, resultado que podría indicar que la acumulación de lípidos en este órgano es especialmente baja.

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de los metabolitos asignados e identificados en tejido intacto, utilizando las regiones de integración recogidas en el Anexo XXXIV. Con estos datos, se construyeron los perfiles metabólicos de tejido intacto para cada órgano, que quedan recogidos en la Figura 9.



**Figura 9. Contribución de cada grupo de metabolitos (polares y apolares) a la composición del perfil metabólico de cada órgano según su análisis mediante HRMAS.**

Los grupos de metabolitos identificados son los mismos que los comentados anteriormente. Hay que tener en cuenta que las proporciones de cada grupo de metabolitos pueden ser variables con respecto a las presentadas en las Figuras 7 y 8 (referentes a extractos) debido a aspectos técnicos del HRMAS. En primer lugar, en estos espectros la resolución es menor, y el solapamiento mayor debido a que encontramos metabolitos tanto polares como apolares. Especialmente si la fracción de metabolitos apolares está muy concentrada, pueden solapar otras señales correspondientes a metabolitos polares e dificultar su cuantificación. Por otro lado, los espectros que se han empleado para realizar la cuantificación, son de tipo CPMG con un filtro de relajación para evitar un solapamiento excesivo de las señales de lípidos. Este filtro puede afectar la intensidad de las señales de metabolitos de forma desigual.

Como se observa en la Figura 9, tal como ya se observó en la fase acuosa, el perfil metabólico de la vesícula biliar presenta grandes diferencias con el del resto de órganos debido a la elevada concentración de ácidos biliares. Sin embargo, el rango de metabolitos que se detectan es mayor debido a la reducción de la intensidad de las señales de los ácidos biliares por el filtro de relajación. Cabe destacar que ojos, timo y pulmón mantienen la similitud, presentando unas proporciones de metabolitos apolares

menores que piel y tráquea, donde la fracción apolar es mayoritaria. Este resultado es coherente con el hecho de que ambos órganos (piel y tráquea) están formados por una parte de tejido adiposo.

Es importante destacar que gracias al análisis de tejido intacto por HRMAS es posible comparar la proporción total de metabolitos apolares de los perfiles metabólicos. Si realizamos perfiles a partir de extractos por separado no es posible comparar la proporción real de lípidos debido a que los datos han sido normalizados por separado. Sin embargo, no tenemos este problema con el análisis mediante HRMAS.

#### 4. Estimación de los metabolitos más abundantes.

A continuación, con los datos de integración de cada órgano se realizó un rango con los diez metabolitos polares más abundantes de cada órgano. El rango se realizó sólo con los metabolitos polares debido a que los espectros obtenidos para los extractos acuosos presentaron mayor sensibilidad y permitieron la cuantificación de un mayor número de metabolitos. No se tuvo en cuenta la vesícula debido a que la presencia de ácidos biliares impidió la cuantificación correcta de otros metabolitos. Los resultados se recogen en la Figura 10.

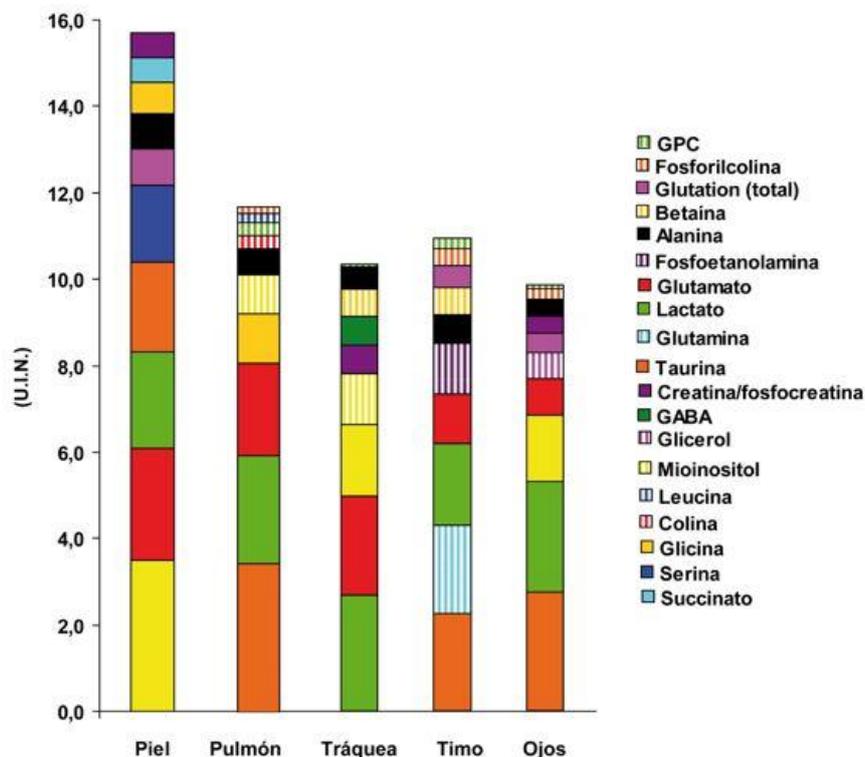


Figura 10. Lista de los metabolitos más abundantes identificados y su distribución en cada órgano. U.I.N.: Unidades de Integración Normalizadas

Como puede observarse en la Figura 10, hay metabolitos que son mayoritarios en todos los órganos como por ejemplo taurina, alanina, lactato y glutamato. Tres de ellos son aminoácidos, dos proteicos (glutamato y alanina) y otro no proteico (taurina). Como se destacó anteriormente en base a la información contenida en la Figura 7, el conjunto de aminoácidos representa el grupo de metabolitos más abundantes en todos los órganos estudiados, de manera que este resultado respaldaría lo anteriormente apuntado.

El glutamato desempeña un papel fundamental en el metabolismo del nitrógeno. Por un lado, constituye un punto de entrada de nitrógeno reducido en forma de amoníaco para el organismo, hasta el punto de que el glutamato es fuente de grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos. En el músculo esquelético, los grupos amino en exceso se transfieren al piruvato donde forman alanina. La alanina es pues, otro aminoácido importante en el transporte de grupos aminos. Junto con otros cinco aminoácidos, entre los que se encuentran la glicina y la serina, proporcionan esqueletos carbonados para la síntesis de piruvato, molécula clave para la obtención de energía (Nelson y Cox, 2008).

La taurina, es uno de los aminoácidos no proteicos más abundantes en prácticamente todos de tejidos del organismo y tiene multitud de funciones. Su principal ruta de biosíntesis es a partir de la cisteína y con la formación de hipotaurina como intermediario (Ueki y Stipanuk, 2007). Fisiológicamente, actúa como citoprotector y atenuador de la apoptosis debido a su actividad antioxidante, inhibiendo la formación de ROS por la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (Ripps y Shen, 2012). Un déficit en taurina puede se ha relacionado con condiciones patológicas tales como un mal funcionamiento de células  $\beta$  pancreáticas (L'Amoreaux *et al.*, 2010).

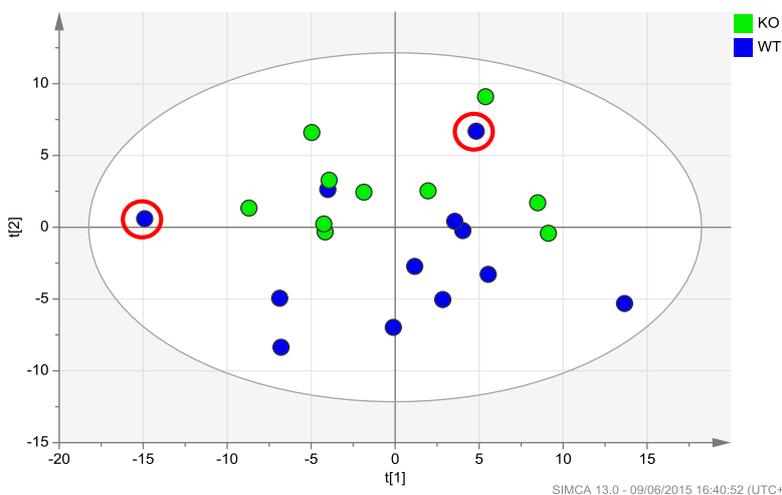
El lactato forma parte de los ácidos orgánicos y es un metabolito central del metabolismo energético de las células. En condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, el piruvato se reduce a lactato, aceptando electrones del NADH y regenerando el NAD necesario para la continuación de la glucólisis. Algunos tipos celulares y tejidos (retina y eritrocitos por ejemplo) convierten la glucosa en lactato incluso en condiciones aerobias. De esta forma, el lactato transportaría poder reductor junto con tres carbonos, que pueden ser usados para la síntesis de glucosa en el hígado (Nelson y Cox, 2008).

IV.b. Resultados y discusión. Parte 2.

En la segunda parte del trabajo, se utilizó la asignación completa de ojos para realizar un estudio metabólico sobre la RD. Para ello se utilizó un modelo de ratón *knock-out* para el gen IRS2. Los niveles de glucosa en sangre de los ratones *knock-out* en el momento de sacrificarlos no superaron los estándares para considerarlos diabéticos. Por lo tanto, el presente modelo simularía un estadio temprano de la enfermedad y de sus complicaciones. En el Anexo XXXV se muestra el nivel de glucosa en sangre y el peso de los ratones analizados. Se puede observar que estos son superiores en ratones KO que en ratones WT. Para el análisis metabólico se utilizaron extractos en lugar de tejido intacto debido a la mayor capacidad para identificar y cuantificar metabolitos. Para cada muestra se adquirieron espectros de fase acuosa y fase orgánica.

### 1. Aplicación del análisis del perfil metabólico de ojo al estudio de la retinopatía diabética.

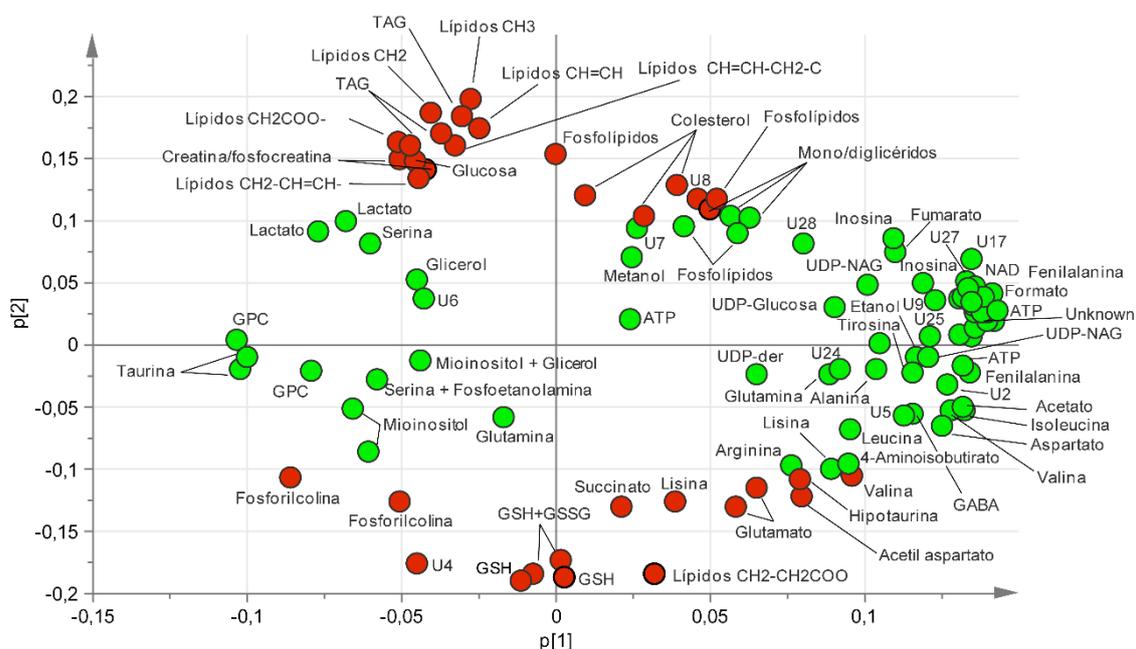
Con el fin de identificar diferencias metabólicas entre las muestras WT y las muestras KO a nivel de ojos, se elaboró un modelo estadístico multivariante en forma de análisis de componentes principales con el programa SIMCA. Como datos de partida para el modelo se utilizaron los valores de integración normalizados y escalados, obtenidos al integrar de forma automática todos los espectros en las regiones previamente definidas para ojos. El modelo generó un total de 6 componentes principales, teniendo un R2 (bondad de ajuste) total de 0.84 y un Q2 (bondad de predicción) total de 0.50. La Figura 11 representa el gráfico *Score Plot* obtenido del modelo.



**Figura 11. Score plot del modelo PCA generado por SIMCA. Las muestras WT que entran en el área de muestras KO se muestran señaladas por un círculo rojo.**

En la Figura 11, se puede observar el *Score Plot* de las dos primeras componentes del modelo, que explican un 58.5% de la variabilidad total. En este gráfico, cada muestra es representada por un punto y se pueden observar tendencias de agrupación entre las muestras. Como se observa en la Figura 11, los ojos de ratones KO se diferencian claramente de los ojos de ratones sanos en el eje horizontal, el componente principal 2. Se pueden identificar dos muestras de ojos WT que aparecen desplazados en el área de muestras KO, marcados con un círculo. Ambos ojos corresponden a un mismo ratón que presentó una concentración de glucosa y un peso elevado para tratarse de un ratón WT (ver Anexo XXXV, ratón 3 con código R3 WT).

A continuación se obtuvo el gráfico *Loading Plot*, que se muestra en la Figura 12. El *Loading Plot* permite identificar los metabolitos que contribuyen a la separación de las muestras en grupos



**Figura 12. Loading Plot del modelo PCA generado por SIMCA. Los metabolitos significativos están señalados en color rojo.**

. El gráfico *Loading Plot* mostrado en la Figura 12 se corresponde con el *Score Plot* de la Figura 11. Por tanto, aquellos metabolitos que se encuentren en la parte superior del componente principal dos (eje horizontal) están aumentados en muestras KO, mientras que los metabolitos situados en la parte inferior del componente principal dos están disminuidos en muestras KO. Sin embargo, no todos los metabolitos son significativos. Los metabolitos más significativos son aquellos que se localizan en las partes más extremas. De manera que para realizar un análisis cuantitativo más detallado

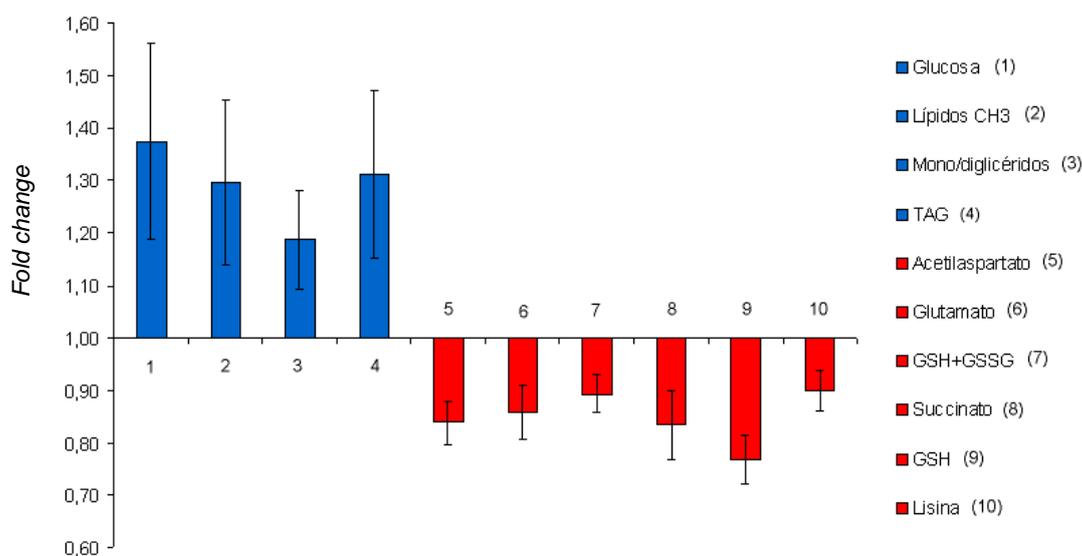
de los metabolitos significativos en muestras KO, se tuvieron en cuenta los que se encuentran por encima de 0,1 y por debajo de -0,1 del componente principal.

Para confirmar la significancia estadística de estos metabolitos, se realizó un análisis estadístico univariante y se calculó el valor de cambio o *fold change* para cada uno. Los metabolitos diferenciales entre ambos tipos de muestra y que resultaron estadísticamente significativos son recogidos en la Tabla 2.

**Tabla 2. Metabolitos significativamente estadísticos y diferenciales entre muestras WT y KO.**

Metabolitos	Media (WT)	Media (KO)	Fold change	t-Student
Glucosa	0,0013 ± 0,0002	0,0018 ± 0,0001	1,38 ± 0,19	0,027
Lípidos CH3	0,0462 ± 0,0047	0,0599 ± 0,0039	1,30 ± 0,16	0,042
Mono/diglicéridos	0,0029 ± 0,0002	0,0034 ± 0,0002	1,19 ± 0,09	0,043
TAG	0,0070 ± 0,0008	0,0092 ± 0,0005	1,31 ± 0,16	0,034
Acetilaspártato	0,0044 ± 0,0002	0,0037 ± 0,0001	0,83 ± 0,04	0,003
Glutamato	0,0165 ± 0,0007	0,0142 ± 0,0006	0,86 ± 0,05	0,021
GSH+GSSG	0,0164 ± 0,0005	0,0147 ± 0,0004	0,89 ± 0,04	0,013
Succinato	0,0026 ± 0,0002	0,0022 ± 0,0001	0,83 ± 0,07	0,040
GSH	0,0040 ± 0,0002	0,0029 ± 0,0002	0,75 ± 0,07	0,003
Lisina	0,0073 ± 0,0002	0,0065 ± 0,0002	0,90 ± 0,04	0,019

Para ilustrar los cambios en los metabolitos significativos en muestras KO, en la Figura 13 se muestra una representación gráfica de los valores de cambio de cada metabolito presente en la Tabla 2.



**Figura 13. Gráfico de barras del fold change de los metabolitos significativos estadísticamente.**

Como se muestra en la Figura 13, se confirma que entre los metabolitos significativamente aumentados en muestras provenientes de ratones KO encontramos la glucosa y metabolitos relacionados con el metabolismo de lípidos. En cuando a los metabolitos significativamente reducidos en ratones KO encontramos el glutatión, distintos aminoácidos y el succinato. Estos resultados son consistentes con las características que presenta la DM: hiperglicemia, metabolismo de lípidos alterado y estrés oxidativo, debido a una disminución de glutatión.

Es importante subrayar que estos cambios metabólicos se han detectado en ratones que todavía no habían desarrollado completamente la enfermedad. Por lo tanto, se demuestra que los daños oculares empiezan a producirse en estadios tempranos de la DM. Los diez metabolitos identificados como significativos se pueden considerar como candidatos a biomarcadores del avance de la RD en ratón. Una aplicación muy útil de estos biomarcadores podría ser el estudio de la eficacia de nuevos tratamientos contra la RD en modelos animales. Por otro lado, el estudio de las rutas metabólicas asociadas a las variaciones de estos compuestos puede ayudar a una mejor comprensión de la RD.

## **2. Efecto de la glucosa en alteraciones microvasculares en el ojo.**

La glucosa es uno de los metabolitos que aparecen aumentados en las muestras KO. Este resultado es consistente con el hecho de que la hiperglicemia es considerada el primer factor patogénico en el desarrollo de la DM, a pesar de que no se conocen completamente los mecanismos por los cuales los elevados niveles de glucosa en sangre causan daños en los tejidos (Caldwell *et al.*, 2003)

En el caso de la RD, los efectos de la DM empiezan a manifestarse mediante alteraciones bioquímicas y celulares en el sistema vascular del ojo. Algunas de las alteraciones vasculares que dan comienzo a estos estados son: un aumento de la adhesión de leucocitos a las paredes de los vasos, alteraciones en el flujo de sangre, o la muerte celular (Caldwell *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la elevada concentración en glucosa induce muerte celular en forma de apoptosis en las primeras etapas de complicaciones diabéticas.

Por otro lado, en la retina uno de los factores que más contribuyen a la aparición de alteraciones vasculares es la pérdida de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se ha demostrado que la hiperglicemia altera varias rutas de señalización que

conducen a la desfosforilación del receptor b de PDGF y una reducción de su actividad, terminando en apoptosis de las células (Gerald *et al.*, 2009).

### 3. Efecto del estrés oxidativo en daños oculares.

Como se muestra en la Figura 16, se observa una reducción importante de glutatión, especialmente glutatión en forma reducida (GSH), en ojos diabéticos. Debido a la capacidad antioxidante del glutatión, una disminución tan importante puede indicar un aumento del estrés oxidativo en ojos. Al igual que la piel, la retina está muy expuesta a la radiación solar, de manera que es especialmente susceptible de sufrir estrés oxidativo. En la literatura se pueden encontrar cuatro mecanismos principales en los que la hiperglicemia aumenta el estrés oxidativo.

En primer lugar, cuando la concentración de glucosa es elevada, parte de ella puede ser reducida a sorbitol que puede convertirse en fructosa mediante la poliol deshidrogenada. En esta reacción se consume Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH), necesario para regenerar glutatión a partir de glutatión reducido. Una disminución de NADPH llevará asociada una disminución de los niveles de glutatión (Wu *et al.*, 2014).

Asimismo, la hiperglicemia puede resultar en un aumento intracelular de los precursores de diglicéridos. Las proteínas quinasas C son activadas, entre otras señales, por un aumento en la concentración de diglicéridos y contribuyen a la producción de ROS y estrés oxidativo aumentando la actividad del enzima NADPH oxidasa (Wu *et al.*, 2014).

La glucosa también puede reaccionar no enzimáticamente con aminoácidos, lípidos o ácidos nucleicos, modificándolos y generando productos finales de glicación avanzada. Se ha demostrado la conexión de este tipo de partículas con aumento del estrés oxidativo y complicaciones de la DM (Singh *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que un aumento del estrés oxidativo en tejidos oculares como la retina en casos de DM, está relacionado con el desarrollo de RD (Kowluru, 2003). En este contexto, los antioxidantes como el glutatión juegan un papel fundamental para amortizar y disipar la toxicidad producida por los radicales libres. Para la síntesis del glutatión se requiere glutamato y cisteína libres. Como se muestra en la Figura 16, hay una disminución de glutamato en las muestras KO, que puede indicar una disminución en la síntesis de glutamato.

#### **4. Toxicidad de los metabolitos de tipo lipídico en diabetes mellitus.**

La obesidad es uno de los factores de riesgo más prevalentes de DM tipo II, de manera que, además de la hiperglicemia, también se caracteriza por una elevada cantidad de lípidos o hiperlipidemia. Tal como se ha indicado anteriormente, también los ratones modelo sufren un aumento de peso en consecuencia de la hiperglicemia. Si se produce una sobreacumulación de ácidos grasos libres, las células del tejido adiposo no son capaces de almacenarlos y estos son desplazados a tejidos no adiposos (Kusminski *et al.*, 2009), como ocurre en este caso en el ojo.

El motivo de esta acumulación de lípidos es que la insulina suprime la lipólisis de triglicéridos a ácidos grasos libres. En individuos con DM tipo II, donde la resistencia a insulina afecta a sus funciones biológicas, la inhibición de la lipólisis no ocurre y aumenta el contenido en ácidos grasos libres (Feingold y Grunfeld, 2015).

Existe la hipótesis de que hiperglicemia e hiperlipidemia actúan conjuntamente dañando las células  $\beta$ . En presencia de concentraciones no patológicas de glucosa, los ácidos grasos son rápidamente oxidados en las mitocondrias. Sin embargo, en circunstancias de elevada concentración tanto de glucosa como de ácidos grasos, los ácidos grasos pueden entrar en rutas alternativas generándose grupos funcionales reactivos que dañan las células. Asimismo, en presencia de elevados niveles de glucosa, la presencia de ácidos grasos puede inhibir la expresión de genes relacionados con la insulina contribuyendo al desarrollo de la DM (Kusminski *et al.*, 2009; Poitout y Robertson, 2002).

## V. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha determinado por primera vez el perfil metabólico de ojos, timo, vesícula, tráquea y piel de ratón, tanto a partir de extracto como utilizando muestras de tejido intacto. La información obtenida, tanto en materia de identificación de metabolitos como de perfil metabólico, resulta de una gran utilidad para futuros estudios metabólicos.
2. De igual manera, se ha realizado por primera vez una comparación exhaustiva del análisis de tejido intacto por HRMAS y del análisis a partir de extractos de órganos de ratón, valorándose las ventajas y desventajas de cada método. Se concluyó que HRMAS tiene un gran potencial debido a la posibilidad de analizar metabolitos polares y apolares a la vez, de manera que es posible analizar la proporción real de lípidos en la muestra. Sin embargo, para estudios de búsqueda de biomarcadores, es preferible utilizar extractos, ya que es posible identificar y cuantificar un mayor número de metabolitos.
3. Finalmente, con los resultados obtenidos en el estudio metabólico aplicado a la RD, se ha demostrado la existencia de metabolitos significativamente diferenciales entre muestras WT y KO. Por un lado, estos metabolitos demuestran que existen rutas metabólicas alteradas en ojo en estadios temprano de DM que pueden contribuir al desarrollo de la retinopatía. Por su importancia, destaca el metabolismo de los azúcares y de los lípidos, así como procesos relacionados con la generación de estrés oxidativo. Por otro lado, estos metabolitos identificados constituyen perfectos candidatos a biomarcadores en estadio temprano de la enfermedad para el desarrollo de nuevos fármacos efectivos contra la enfermedad. En conclusión, el análisis metabólico de las muestras constituyó un buen estudio piloto para futuros avances en el estudio de la RD.

**VI. BIBLIOGRAFÍA**

- ABCOUWER, S.F.; GARDNER, T.W. (2014). Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann N Y Acad Sci*, 1311: 174-190.
- AHSAN, H. (2015). Diabetic retinopathy – Biomolecules and multiple pathophysiology. *Diabetes Metab Syndr*, 9: 51-54.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. (2002). New York: Garland Science.
- ALPER, M.G.; ZIMMERMAN, L.E.; SHERMAN, J.L. (1986). Clinicopathologic correlation of orbital magnetic resonance imaging. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 84: 192-220.
- BARBA, I.; GARCÍA-RAMÍREZ, M.; HERNÁNDEZ, C.; ALONSO, MA.; MASMIQUEL, L.; GARCÍA-DORADO, D.; *et al.* (2010). Metabolic Fingerprints of Proliferative Diabetic Retinopathy: A <sup>1</sup>H-NMR-Based Metabonomic Approach Using Vitreous Humor. *IOVS*, 51: 4416-4421.
- BASTAKI S. (2005). Diabetes mellitus and its treatment. *J Diabetes & Metabolism*, 13: 111-134.
- BECKONERT, O.; COEN, M.; KEUN, H.C.; WANG, Y.; EBBELS, T.M.D.; HOLMES, E.; *et al.* (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat protoc*, 5: 1019-1032.
- BECKONERT, O.; KEUN, H.C.; EBBELS, T.M.D.; BUNDY, J.; HOLMES, E.; LINDON, J.C.; *et al.* (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat protoc*, 2: 2692-2703.
- BENOURAD, F.; KAHVECIOGLU, Z.; YUCEF-BENKADA, M.; COLET, J.M. (2014). Prospective evaluation of potential toxicity of repeated doses of *Thymus vulgaris* L. extracts in rats by means of clinical chemistry, histopathology and NMR-based metabonomic approach. *Drug Test Anal*, 6: 1069-75.
- BICKERS, D.R.; ATHAR, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*, 126: 2565-2575.
- BOLLARD, M.E.; STANLEY, E.G.; LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E. (2005). NMR-based metabonomics approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed*, 18: 143–162.

- CALDWELL, R.B.; BARTOLI, 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.
- CARLON, M.; TOELEN, J.; VAN DER PERREN, A.; VANDENBERGHE, L.H.; REUMERS, V.; SBRAGIA, L. (2010). Efficient Gene Transfer Into the Mouse Lung by Fetal Intratracheal Injection of rAAV2/6.2. *Mol Ther*, 18: 2130-2138.
- CLAYTON, T.A.; LINDON, J.C.; ANTTI, H.; CHARUEL, C.; HANTON, G.; PROVOST, J.P.; *et al.* (2006). Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalised drug treatment. *Nature*, 440: 1535–1542.
- DANEMAN, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*, 367: 847-858.
- DUNN, W.B.; BAILEY, N.J.; JOHNSON, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130: 606–625.
- EISMA, J.H.; DULLE, J.E.; FORT, P.E. (2015). Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. *World J Diabetes*, 6: 312-320.
- FAUVELLE, F.; CARPENTIER, P.; DORANDEU, F.; FOQUIN, A.; TESTYLIER, G. (2012). Prediction of neuroprotective treatment efficiency using a HRMAS NMR-based statistical model of refractory status epilepticus on mouse: a metabolomic approach supported by histology. *J Proteome Res*, 11: 3782-3795.
- FEINGOLD, K.; GRUNFELD, C. (2000). Role of Glucose and Lipids in the Cardiovascular Disease of Patients with Diabetes [Internet]. South Dartmouth (MA); visto el 23 de junio de 2015. En: *Endotext*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278947/>
- FIEHN, O. (2007). Cellular Metabolomics: The Quest for Pathway Structure. En: *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. 1st edición. The Netherlands: Elsevier; p. 1-34.
- FIEHN, O. (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 48: 155–171.
- FLETCHER, B.; GULANICK, M.; LAMENDOLA, C. (2002). Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs*, 16: 17-23.

- GERALDES, P.; HIRAOKA-YAMAMOTO, J.; MATSUMOTO, M.; CLERMONT, A.; LEITGES, M.; MARETTE, A.; *et al.* (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med*, 15: 1298-1306.
- HALOUSKA, S.; POWERS, R. (2006). Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data. *J Magn Reson*. 2006; 178:99-95.
- HAMEED, I.; MASOODI, S.R.; MIR, S.A.; NABI, M.; GHAZANFAR, K.; GANAI, B.A. (2015). Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes*, 6: 598-612.
- HASEGAWA, S.; MOROKOSHI, Y.; TSUJI, A.B.; KOKUBO, T.; AOKI, I.; FURUKAWA, T.; *et al.* (2015). Quantifying initial cellular events of mouse radiation lymphomagenesis and its tumor prevention in vivo by positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Mol Oncol*, 9: 740-748.
- 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.
- HU, J.Z.; ROMMEREIM, D.N.; MINARD, K.R.; WOODSTOCK, A.; HARRER, B.J.; WIND, R.A.; *et al.* (2008). Metabolomics in Lung Inflammation: A High-Resolution <sup>1</sup>H NMR Study of Mice Exposed to Silica Dust. *Toxicol Mech Methods*, 18: 385-398.
- JAYALAKSHMI, K.; SONKAR, K.; BEHARI, A.; KAPOOR, V.K.; SINHA, N. (2011). Lipid profiling of cancerous and benign gallbladder tissues by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *NMR Biomed*, 24: 335-342.
- KHANDELWAL, P.; STRYKER, S.; CHAO, H.; ARANIBAR, N.; LAWRENCE, R.M.; MADIREDDI, M.; *et al.* <sup>1</sup>H NMR-based lipidomics of rodent fur: species-specific lipid profiles and SCD1 inhibitor-related dermal toxicity. *J Lipid Res*, 55: 1366-1374.
- 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.
- KRYCZKA, T.; WYLĘGAŁA, E.; DOBROWOLSKI, D.; MIDELFART, A. (2014). NMR Spectroscopy of Human Eye Tissues: A New Insight into Ocular Biochemistry. *The Scientific World Journal*, 2014: 546192.
- KULLER, L.; ARNOLD, A.; TRACY, R.; OTVOS, J., BURKE, G.; PSATY, B.; *et al.* (2002). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol*, 22: 1175–1180.

KUMINSKI, C.M.; SHETTY, S.; ORCI, L.; UNGER, R.H.; SCHERER, P.E. (2009). Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*, 14: 1484-1495.

L'AMOREAUX, W.J.; CUTTITA, C.; SANTORA, A.; BLAIZE, J.F.; TACHJADI, J.; EL IDRISI, A. (2010). Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cells lines. *J Biomed Sci*, 17(Suppl 1):S11.

LEHTIMAKI, K.K.; VALONEN, P.K.; GRIFFIN, J.L.; VAISANEN, T.H.; GROHN, O.H.J.; KETTUNEN, M.I.; *et al.* (2003). Metabolite changes in BT4C rat gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death as studied by H-1 NMR spectroscopy in vivo, ex vivo, and in vitro. *J. Biol. Chem*, 278: 45915–45923.

LIN, C.Y.; WU, H.; TJEERDEMA, R.S.; VIANT, M.R. (2007). Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, 3: 55-66.

MASAHIRO, S.; SATSUKI, I.; KANAKO, N.; MASARU, T.; HIDEYO, S.; TOMOYOSHI, S. (2012). MMMDB: Mouse Multiple Tissue Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*, 40: 809-814.

MAYR, M.; LIEM, D.; ZHANG, J.; LI, X.; AVLIYAKULOV, N.K.; YAN, J.I.; *et al.* (2009). Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 46: 268-277.

MEGÍAS, M.; MOLIST, P.; POMBAL, M.A. (2007). Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Vigo; visto el 23 de junio de 2015. Disponible en: <http://mmegias.webs2.uvigo.es/inicio.html>.

MENAZZA, S.; WONG, R.; NGUYEN, T.; WANG, G.; GUCEK, M.; MURPHY, E. (2013). CypD(-/-) hearts have altered levels of proteins involved in Krebs cycle, branch chain aminoacid degradation and pyruvate metabolism. *J Mol Cell Cardiol*, 56: 81-90.

NELSON, D.L.; COX, M.M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. 5th edition. New York: W. H. Freeman and Company.

NENTWICH, M.M.; ULBIG, M.W. (2015). Diabetic retinopathy – ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6: 489-499.

NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; LINDON, J.C.; WILSON, I.D. (2004). The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nat. Biotechnol* 22: 1268-1274.

- NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; LINDON, J.C. (2007). Metabonomics and Metabolomics Techniques and Their Applications in Mammalian Systems. En: *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. 1st edición. The Netherlands: Elsevier; p. 1-34.
- PINAL-FERNÁNDEZ, I.; MARTÍN-PASTOR, M.; FERRO-GALLEGO, P.; DOMÍNGUEZ-GERPE, L. (2011). Ex vivo proton NMR analysis and characterization of thymus lipid metabolites and their variation with age in C57BL/6 mice. *Curr Aging Sci*, 4: 57-69.
- POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. (2002). Secondary  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes - A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology*, 143: 339-342.
- RIPPS, H.; SHEN, W. (2012). Taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis*, 18: 2673-2686.
- ROBINSON, R.; BARATHI, V.A.; CHAURASIA, S.S.; WONG, T.Y.; KERN, T.S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech*, 5: 444-456.
- ROCHA, C.M.; BARROS, A.S.; GIL, A.M.; GOODFELLOW, B.J.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M.; *et al.* (2010). Metabolic Profiling of Human Lung Cancer Tissue by 1H High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy. *J Proteome Res*, 9: 319-32.
- ROCHFORD, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod*, 68: 1813-1820.
- ROSENTHAL, N.; BROWN, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol*, 9: 993-999.
- SALEK, R.M.; XIA, J.; INNES, A.; SWEATMAN, B.C.; ADALBERT, R.; RANDLE, S.; *et al.* (2010). A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurochem Int*, 56: 937-947.
- SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44: 129-146.
- SOEUR, J.; EILSTEIN, J.; LEREAUX, G.; JONES, C.; MARROT, L. (2015). Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH byosynthesis. *Free Radic Biol Med*, 78: 213-223.

- UEKI, I.; STIPANUK, M.H. (2007). Enzymes of the taurine biosynthetic pathway are expressed in rat mammary gland. *J Nutr.* 137: 1887-1894.
- VANDAMME, T.F. (2015). Rodent models for human diseases. *Eur J Pharmacol*, 759: 84-89.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. (2007). NMR-based metabolomics at work in Phytochemistry. *Phytochem Rev*, 6: 3–14.
- WHITEHEAD, T.L.; KIEBER-EMMONS, T. (2005). Applying in vitro NMR spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR metabonomics to breast cancer characterization and detection. *Prog NMR Spectrosc*, 47: 165–174.
- WU, Y.; TANG, L.; CHEN, B. (2014). Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 752387.
- YI, L.Z.; HE, J.; LIANG, Y.Z.; YUAN, D.L.; CHAU, F.T. (2006). Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GCMS and PLS-LDA. *FEBBS Lett*, 580: 6837–6845.
- YI, X.; SCHUBERT, M.; PEACHEY, N.S.; SUZUMA, K.; BURKS, D.J.; KUSHNER, J.A.; *et al.* (2005). Insulin Receptor Substrate 2 Is Essential for Maturation and Survival of Photoreceptor Cells. *J Neurosci*, 25: 1240-1248.
- ZUPPI, C.; MESSANA, I.; TAPANAINEN, P.; KNIP, M.; VINCENZONI, F.; GIARDINA, B.; *et al.* (2002). Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine from children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin Chem*, 48: 660–662.