



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina. Departamento de Medicina

Programa de Doctorado 3139 Medicina

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA EN
LA EVOLUCIÓN FISIOPATOLÓGICA HACIA
LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Presentada por:

Mariam Cortés Tormo

Dirigida por:

Dr. José Vicente Marcos Tomás

Dr. Vicente Giner Galvañ

Dr. Josep Redon i Mas

Valencia, enero de 2023



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina.

Departamento de Medicina.

Programa Doctorado 3139 Medicina

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA EN LA EVOLUCIÓN FISIOPATOLÓGICA
HACIA LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Presentada por:

Mariam Cortés Tormo

Licenciada en Farmacia

Dirigida por:

José Vicente Marcos Tomás

Vicente Giner Galvañ

Josep Redon i Mas

Valencia, enero de 2023

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: MARCOS TOMÁS, JOSE VICENTE N.I.F. 19850531J,
Departamento/Instituto: DEPARTAMENTO DE METABOLOPATÍAS. SERVICIO ANÁLISIS CLÍNICOS
Centro: HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE, VALENCIA

2.- Apellidos y nombre: GINER GALVAÑ, VICENTE N.I.F.21474899Y Departamento/Instituto:
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA Centro: HOSPITAL MARE DE DÉU DELS LLIRIS. ALCOY.

3.- Apellidos y nombre: REDÓN I MÁS, JOSEP N.I.F. 19866857D, Departamento/Instituto:
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Centro: FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre..N.I.F., Departamento/Instituto:, Centro:

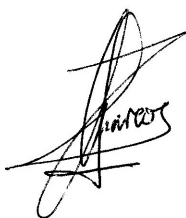
Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: **“Caracterización
metabolómica en la evolución fisiopatológica hacia la diabetes mellitus tipo 2”**

de D/Dña. MARÍA DESAMPARADOS CORTÉS TORMO,

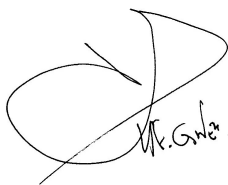
estudiante del Programa de Doctorado **3042 Medicina** (RD1393/2007), **3139 Medicina**
(RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE
(favorable/desfavorable) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 20/12/2022

Fdo.: Dr. José Vicente Marcos Tomás Fdo.: Dr. Vicente Giner Galvany Fdo.: Dr. Josep Redón i Más



Director/a



Director/a



Director/a

DOCTORAL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

A Maia y Guillermo,
por acompañarme en una parte de esta aventura.

A Ezequiel,
por ser mi gran apoyo.

A mis padres, Juan y Amparo, y a mi hermana Ivana,
porque gracias a ellos he llegado hasta aquí.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi amigo, compañero y director de tesis, Dr. José Vicente Marcos Tomás, por confiar en mí y ayudarme a hacer realidad este proyecto. No he conocido a otra persona que le ponga tanta pasión a su trabajo.

A mis directores de tesis; Dr. Vicente Giner Galvañ y Dr. Josep Redón i Mas. Muchas gracias por vuestra orientación, dedicación y profesionalidad.

A la Dra. Vannina González Marrachelli, por todo tu trabajo y dedicación. Eres una profesional admirable.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Relevancia de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

1.1.1. Epidemiología	3
1.1.2. Patologías asociadas a la DM2 y sus complicaciones	10
1.1.2.1. Enfermedad cardiovascular	11
1.1.2.2. Enfermedad renal	14
1.1.2.3. Retinopatía diabética	15
1.1.2.4. Neuropatía diabética	16

1.2. Caracterización patofisiológica de la DM2

1.2.1. Fisiopatología de la DM2. El continuo disglucémico	16
1.2.2. Factores de riesgo de desarrollo de DM2 y comorbilidades asociadas...20	
1.2.2.1. Factores no modificables	20
1.2.2.2. Factores modificables	21
1.2.3. Mecanismos celulares implicados en la génesis del continuo disglucémico.....	27
1.2.3.1. Vía de la AMPK (<i>AMP-activated protein kinase</i>)	30
1.2.3.2. Vía de los PPARs (<i>Peroxisome proliferator activated receptors</i>)	32
1.2.3.3. Vía de la adiponectina	32
1.2.3.4. Vía de la leptina.....	33
1.2.3.5. Visión integrada de los mecanismos celulares conducentes a la disglucemia.....	34
1.2.4. Heterogeneidad fenotípica y necesidad de mejores marcadores.....	43

1.3. Medicina personalizada: Metabolómica

1.3.1. Fundamentos de la metabolómica: Definición y principios	44
1.3.2. Técnicas de estudio en metabolómica	47
1.3.2.1. Resonancia magnética nuclear de protón (H-NMR)	47
1.3.2.2. Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC- MS)	51
1.3.2.3. Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS).....	54

1.3.3. Análisis e interpretación de los resultados metabólicos.....	56
1.4. Metabolómica en la DM2	
1.4.1. Marcadores metabólicos de desarrollo de DM2.....	58
1.4.2. Marcadores metabólicos de desarrollo de complicaciones diabéticas .	
1.4.2.1. Complicaciones macrovasculares	64
1.4.2.2. Complicaciones microvasculares	66
1.4.3. Marcadores metabólicos de respuesta a fármacos antidiabéticos....	67
2. PERTINENCIA Y TRASCENDENCIA DEL PROYECTO ACTUAL	79
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	83
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo principal	87
4.2. Objetivos secundarios	87
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Tipo de estudio	91
5.2. Población de estudio	91
5.2.1. Criterios de inclusión	92
5.2.2. Criterios de exclusión.....	92
5.3. Procedimientos	92
5.4. Variables del estudio	94
5.5. Metodología del laboratorio	
5.5.1. Análisis convencional.....	97
5.5.2. Análisis metabólico.....	98
5.6. Análisis estadístico	
5.6.1. Análisis descriptivo de la muestra	99
5.6.2. Análisis estadístico metabólico	100
5.7. Aspectos éticos	102
6. RESULTADOS	
6.1. Características de la muestra	107
6.2. Resultados análisis metabólico	
6.2.1. Análisis de los espectros	109
6.2.2. Distribución de metabolitos por categorías glucémicas. Análisis univariado	111

6.2.3. Análisis PCA (<i>Principal Component Analysis</i>) y PLS-DA (<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>)	114
6.2.4. VIP SCORES (<i>Variable Importance Plot</i>) y BOXPLOT (Diagrama de Cajas)	116
6.2.5. Matriz de confusión para el modelo de clasificación	120
6.2.6. Estudio de correlación entre metabolitos	121
7. DISCUSIÓN	131
7.1. Metabolitos implicados en la diferenciación de las categorías glucémicas según grupos bioquímicos	132
7.1.1. Metabolismo de los aminoácidos (AA)	132
7.1.2. Organonitrogenados: Colina, Dimetilamina y metil-Histidina.....	133
7.1.3. Metabolismo energético: creatinfosfato y creatinina	134
7.1.4. Metabolismo de los ácidos orgánicos.....	135
7.1.5. Metabolismo de los alcoholes y alcaloides: Etanol y Trigonelina	136
7.1.6. Otros.....	136
7.2. Metabolitos implicados en la diferenciación de los grupos glucémicos según categorías glucémicas	137
7.3. Metabolitos implicados en la diferenciación de los grupos glucémicos a lo largo del continuo disglucémico	153
7.4. Fortalezas y limitaciones del presente estudio	158
7.5. Futuras líneas de trabajo	159
8. CONCLUSIONES	161
9. BIBLIOGRAFÍA	165
10. ANEXOS	
Anexo 1: Consentimiento informado	179
Anexo 2: Hoja de recogida de datos de pacientes	182
Anexo 3: Documento Comité Ético de Investigación (CEI) del Departamento de salud de Alcoy	184

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

AA:	Aminoácidos
AAAr:	Aminoácidos aromáticos
AAR:	Aminoácidos ramificados
ACC:	Acetil-CoA carboxilasa
ACSF3:	Malonil-coA sintetasa
ADA:	<i>American Diabetes Association</i>
ADMA:	Dimetilarginina asimétrica
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt:	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP:	Adenosin difosfato
AG:	Ácido graso
AGCL:	Ácidos grasos de cadena larga
AGE:	<i>Advanced glycation end products</i>
AGL:	Ácido graso libre
ALDH2:	Aldehído deshidrogenasa 2
α -HB:	Alpha-hidroxibutirato
AMP:	Adenosin monofosfato
AMPK:	Adenosin monofosfato quinasa
AP:	Atención Primaria
ApoB:	Apolipoproteína B-100
APOE:	Apolipoproteína E
ARB:	Bloqueador del receptor de angiotensina
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP:	Adenosin trifosfato
ATP-III:	<i>Adult Treatment Panel</i>
AUC:	Área bajo la curva
BCAT2:	Transaminasa-2 de aminoácidos de cadena ramificada muscular
BCKDH:	Complejo deshidrogenasa de aminoácidos ramificados
C:	Modelo de clasificación
CDKN2A:	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
COA:	Coenzima A

COX2: Ciclooxygenasa 2

CpG: *Cytosine-phosphate-Guanine dinucleotides*

CpG-SNP: Islas de metilación del ADN

CPTI: Carnitín palmitoil-transferasa I

CrP: Creatinfosfato

CV: Cardiovascular

DLP: Dislipemia

DM: Diabetes Mellitus

Dm: Grupo con Diabetes Mellitus Tipo 2

DM1: Diabetes Mellitus Tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DMG: Diabetes Mellitus gestacional

DPP-4: Dipeptidil peptidasa-4

EC: Enfermedad coronaria

ECV: Enfermedad cardiovascular

EKG: Electrocardiograma

eNOS: Sintasa del óxido nítrico endotelial

EPIRCE: Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica

ERC: Enfermedad Renal Crónica

ERD: Enfermedad Renal Diabética

ESC: *European Society of Cardiology*

EUA: Excreción urinaria de albúmina

FID: *Free Induction Decay*

FN: Falso negativo

FP: Falso positivo

GAA: Glucosa Alterada en Ayunas

GC: Cromatografía de gases

Glu: Glutamato

GLUT-4: Transportador de glucosa 4

Gln: Glutamina

GLP-1: *Glucagon-like peptide-1*

GPA: Glucosa plasmática en ayunas

GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa-3
GWAS: *Genome Wide Association*
HbA1C: Hemoglobina glicosilada
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HTA: Hipertensión arterial
HMDB: *Human Metabolomics Database*
HOMA: *Homeostatic model assessment*
H-NMR: Resonancia magnética nuclear de protón
HPLC: *High performance liquid chromatography*
HSQC: Espectroscopía de correlación cuántica única heteronuclear
IC: Insuficiencia cardíaca
ICS: Institut Català de la Salut
IDF: Federación Internacional de Diabetes
IL-6: Interleucina-6
IMC: Índice de Masa Corporal
INS: Gen que codifica la insulina
IQR: Rango intercuartílico
IR: Insuficiencia renal
IRS-1: Sustrato 1 del receptor de insulina
ITB: Índice Tobillo-Brazo
LC: Cromatografía líquida
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LDH: Lactato deshidrogenasa
LDL: Lipoproteína de baja densidad
L-GPC: 1-linoleoil-glicerofosfocolina
MAPA: Monitorización ambulatoria de la presión arterial
MAU: Microalbuminuria
MCT1: Transportador de Monocarboxilato
MLYCD: Malonil-coA descarboxilasa
MS: Espectrometría de masas
m/z: Masa/carga
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (hidrogenada)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (hidrogenada)

NDMA: N-nitrosodimetilamina

NF- κ B: Factor nuclear kappa beta

nG: Grupo normoglucémico.

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

O^{2-} : Anión superóxido

ONOO⁻: Peroxidonitrito

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1

PC: Fosfatidilcolina

PCA: Análisis de componentes principales

PCSK9: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

pDm: Grupo prediabéticos.

PDX1: Gen que codifica la proteína *Pancreatic And Duodenal Homeobox 1*

PGC-1 α : Coactivador PPAR

PI3K/Akt: Fosfatidilinositol 3-cinasa/Protein-cinasa B

PKC: Proteincinasa C

PLS-DA: Análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados

³¹P-MRS: Espectroscopia de resonancia magnética de fósforo-31

PPAR: Receptor de activación de factores de proliferación peroxisomal

Q: Cuartil

RAGE: *Receptor Advanced glycation end products*

RCV: Riesgo Cardiovascular

RI: Resistencia a insulina

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RR: Riesgo relativo

SDH: Succinato deshidrogenasa

SIDIAP: Sistema d'Informació per al Desenvolupament de la Investigació en Atenció Primària

Slc16a1: Gen que codifica el transportador de monocarboxilato

SOD: Superóxido dismutasa

SIRT1: Sirtuina 1

SM: Síndrome metabólico

SNPs: *Single-Nucleotide Polymorphisms*

SR-B: Receptor *Scavenger* tipo B

TAG: Tolerancia Alterada a Glucosa

TFG: Tasa de Filtración Glomerular

TG: Triglicéridos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TOCSY: Espectroscopía de correlación homonuclear

TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa

UCP: Proteína de desacoplamiento

VC: Validación cruzada

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VN: Verdadero negativo

VP: Verdadero positivo

ZDF: *Zucker diabetic fatty*

2hGP: Glucosa plasmática a las 2 horas post-sobrecarga de 75 g de glucosa

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

<u>TABLAS</u>	Página
Tabla 1. Comparativa de la Resonancia Magnética Nuclear de protón (H-NMR) y la Espectroscopía de Masas (MS)(Modificación)	56
Tabla 2. Metabolitos relacionados con DM2, prediabetes y DM1	62
Tabla 3. Metabolitos relacionados con el desarrollo de complicaciones diabéticas macrovasculares y microvasculares	67
Tabla 4. Marcadores metabolómicos de respuesta a fármacos antidiabéticos	71
Tabla 5. Criterios diagnósticos categóricos de DM y prediabetes tras TTOG 75 según criterios ADA (<i>American Diabetes Association</i>)	91
Tabla 6. Variables del estudio	94
Tabla 7. Características de la muestra	107
Tabla 8. Comparativa mediante test de <i>Bonferroni</i> entre grupos glucémicos de las 39 regiones de metabolitos identificadas con el análisis de espectros	112
Tabla 9. Diferencias significativas de metabolitos entre diabéticos y no diabéticos (nG+pDm). Análisis univariado.....	113
Tabla 10. Distribución de metabolitos por categorías glucémicas (1: nG; 2: pDm; 3: Dm) tras análisis de Fisher.....	113
Tabla 11. Matriz de confusión para el modelo de clasificación (C) y para la validación cruzada (VC)	120
Tabla 12. Comparativa resultados del estudio actual vs estudios previos	157

Figura 1: Datos de personas con diabetes, entre 20-79 años, en el mundo y por regiones, en el año 2017 y 2045, según la IDF.....	4
Figura 2: Prevalencia en España de Diabetes y Tolerancia Alterada a Glucosa (TAG) en adultos de 20 a 79 años, en 2017, y predicción del 2045, según la IDF	5
Figura 3: Número de muertes a causa de la DM a nivel mundial, en millones, en adultos de 20 a 79 años, en 2017, según la IDF	6
Figura 4: Número de muertes a causa de la DM en Europa, separadas por género y rango de edad comprendida entre 20 a 79 años, en 2017, según IDF.....	7
Figura 5: Comparativa del gasto total sanitario a causa de la DM a nivel mundial, en billones (USD), en adultos de 20 a 79 años, entre los años 2006-2017, según la IDF.....	9
Figura 6: Gasto total sanitario a causa de la DM a nivel mundial, en billones(USD), en adultos de 20 a 79 años, en 2017, según la IDF	10
Figura 7: Evolución de la tasa de mortalidad ajustada por edad de la enfermedad cerebrovascular, enfermedad isquémica del corazón e insuficiencia cardíaca en ambos sexos en España en el período 1975-2014.....	12
Figura 8: Evolución de la tasa de morbilidad hospitalaria de las enfermedades del sistema circulatorio, enfermedad isquémica del corazón y enfermedad cerebrovascular en ambos sexos en España en el período 1975-2014	12
Figura 9: Concentración media de glucosa plasmática en ayunas (GPA) y a las 2h postcarga (2hGP), en 13 cohortes poblacionales europeas incluidas en el estudio DECODE.	18
Figura 10: Continuo disglucémico y ECV. (Imagen modificada).....	19
Figura 11: Algoritmo para el diagnóstico y manejo de la ECV en pacientes con DM	26
Figura 12: Factores de estrés en la célula β en la patología de DM2	29
Figura 13: AMPK como sensor de estrés metabólico y nutricional	31
Figura 14: Regulación de la oxidación de ácidos grasos mediada por el tejido adiposo a través de la leptina y adiponectina.(Imagen modificada).....	34

Figura 15: Rutas metabólicas AGE/RAGE. En la imagen se observa la implicación de algunas de las rutas descritas como PI3K/Akt, NOS y NF- κ B.....	39
Figura 16: Relación entre la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular	42
Figura 17: Visión global de la Biología de sistemas y disciplinas -ómicas.....	46
Figura 18: Precesión de protones alineados a un campo magnético	48
Figura 19: Espectro de H-NMR de 500 MHz típico de un suero humano sano	49
Figura 20: Transformada de Fourier (FT) a partir de <i>Free Induction Decay</i> (FID) para generar un espectro de H-NMR	49
Figura 21: Diagrama esquemático de un sistema de H-NMR	51
Figura 22: Cromatograma obtenido a partir de un suero de humano sano por cromatografía de gases	52
Figura 23: Esquema de un sistema GC-MS.....	53
Figura 24: Esquema de un sistema LC-MS	55
Figura 25: Principales marcadores metabolómicos y vías metabólicas implicadas en población diabética europea respecto de población no diabética	60
Figura 26: Metabolitos implicados en el desarrollo, la progresión y el riesgo de la DM2.....	63
Figura 27: Diagrama de las rutas metabólicas que se han visto alteradas y que han sido detectadas por el análisis de H-NMR en población diabética que han desarrollado EC.....	65
Figura 28: Visión sistemática de las rutas metabólicas asociadas al tratamiento de metformina y/o glimepirida en ratas <i>Zucker diabetic fatty</i> (ZDF).....	69
Figura 29: Espectros solapados de H-NMR de las 136 muestras de orina.....	109
Figura 30: Diagramas de caja y diagramas de densidad de grano antes y después de la normalización.....	110
Figura 31: Análisis PCA (<i>Principal Component Analysis</i>)	114
Figura 32: Análisis PLS-DA (<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>)	115
Figura 33: Curvas ROC Dm y pDm	116
Figura 34: Análisis de los VIP (<i>Variable Importance Plot</i>) scores	117
Figura 35: Representación de análisis <i>boxplot</i> de los 15 metabolitos que son más discriminantes según grupos de categorías glucémicas	119

Figura 36: Análisis de correlación entre los 39 metabolitos mediante mapa de calor	122
Figura 37: Mapa de calor original para cada individuo	124
Figura 38: Representación simplificada del mapa de calor por categorías glucémicas	125
Figuras 39A y 39B: Concentraciones de metabolitos (media y desviación típica) de los metabolitos seleccionados en el mapa de calor en función del grupo glucémico	126
Figura 40: Ciclo de Krebs y sus metabolitos intermediarios	138
Figura 41: Ruta de degradación de colina y eliminación de dimetilamina	139
Figura 42: Liberación y acción paracrina de acetilcolina y glucagón a partir de las células α pancreáticas con respecto a la liberación de insulina en las células beta pancreáticas.....	143
Figura 43: Inhibición de Succinato deshidrogenasa (SDH) por itaconato.....	147
Figura 44: Posible mecanismo de elevación del etanol en DM2 por disfunción ALDH2	150
Figura 45: Inhibición de DPP-4 y α -glucosidasa mediada por trigonelina	151

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Relevancia de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

1.1.1. Epidemiología

La diabetes mellitus (DM) se puede considerar como uno de los principales problemas de salud mundial, entre otras razones por su elevada prevalencia, su elevado coste económico y el número de muertes prematuras que provoca (1,2).

Existe un interés en el estudio de la DM2 que radica en el aumento progresivo de personas que se ven afectas cada año por esta patología como consecuencia de la creciente longevidad, el sobrepeso y la obesidad, resultado de la adopción de estilos de vida diabetógenos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014. La prevalencia mundial de la diabetes en adultos (mayores de 18 años) ha aumentado del 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014. Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (3).

Los datos recogidos en 2017 por la Federación Internacional de Diabetes (IDF) se muestran en la figura 1 e indican que, aproximadamente, el 6% de la población mundial (425 millones de personas entre 20-79 años) padece diabetes y se estima que el número de personas con esta enfermedad se incrementará a 629 millones (un incremento del 48%) (4). Además, también se muestran los datos del número total de personas con diabetes en Europa, que suman un total de 58 millones, y que representa el 8.8% de la población europea comprendida entre las edades de 20-79 años (4). En Europa, la prevalencia de la DM2 se ha elevado entre todas las edades debida, principalmente, a un incremento en el sobrepeso y la obesidad, a una dieta insana y a un estilo de vida sedentario (2,5). El incremento de estos cuatro factores ha llevado a la aparición de DM2 en niños, adolescentes y adultos jóvenes a nivel mundial, dejando de ser esta patología de aparición exclusiva en personas en edad avanzada (4).

1. Introducción

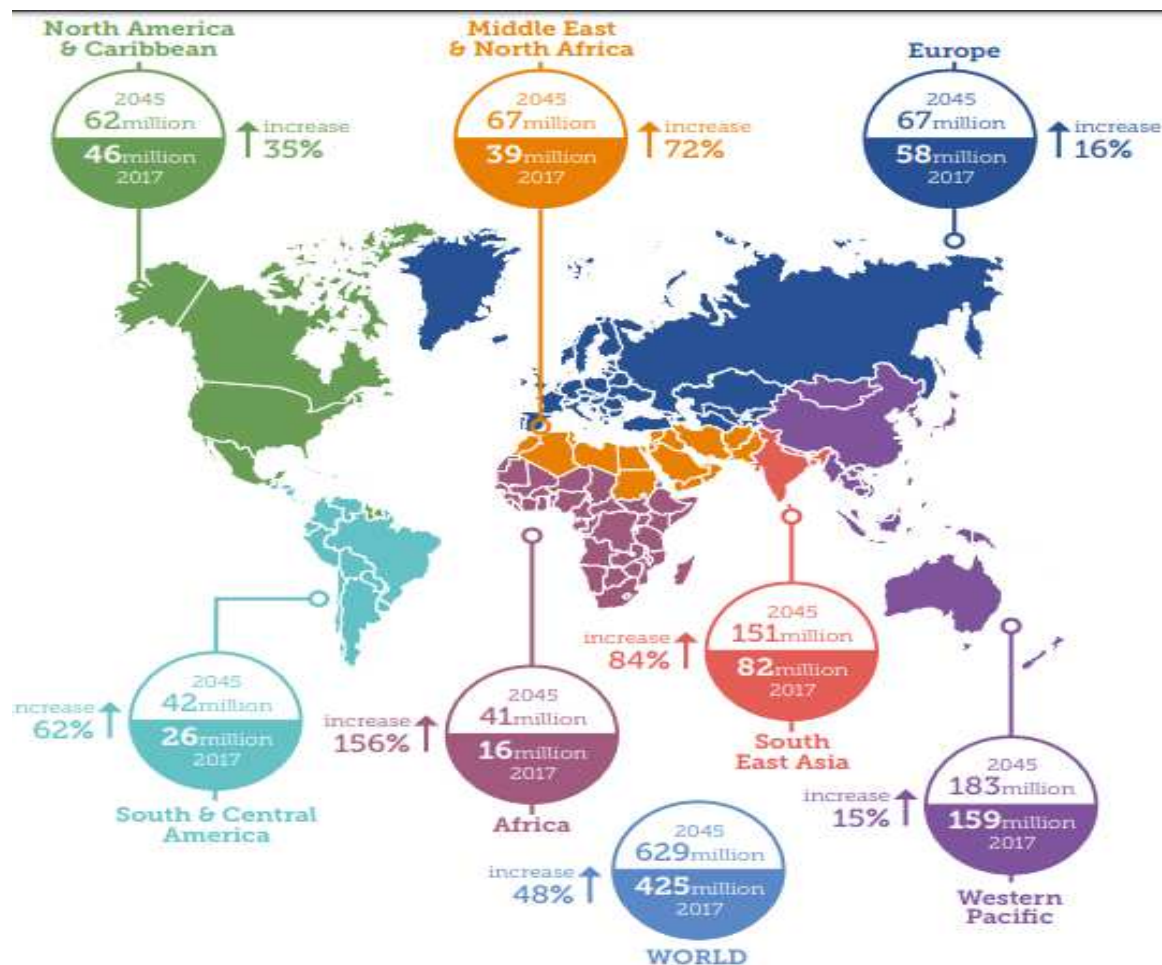


Figura 1: Datos de personas con diabetes, entre 20-79 años, en el mundo y por regiones, en el año 2017 y 2045, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF)(4).

Para evaluar la situación en la que nos encontramos con respecto a este punto, en 2014 se realizó en España un estudio transversal (con dos fases simultáneas) y multicéntrico, de ámbito nacional, en condiciones de práctica clínica habitual. En la primera fase, diseñada para el cálculo de la prevalencia de DM2, se incluyeron 169.023 pacientes, y en la segunda fase, 7.754 pacientes, sobre los que definir el perfil sociodemográfico, clínico y metabólico de la DM2 en función del índice de masa corporal (IMC). Se evaluó la prevalencia de la DM2 en pacientes con sobrepeso u obesidad, cuyo resultado fue del 23,6%, siendo del 17,8% en los pacientes con sobrepeso y del 34,8% en los obesos (6).

En la figura 2, se observa los datos recogidos en 2017 por la IDF sobre la prevalencia de la DM y de la Tolerancia Alterada a Glucosa (TAG), en la población española, donde se indica que el 10.43% de la población presenta DM y que el 7.85% presenta TAG. Además, también se representa los posibles datos sobre prevalencia de DM y de TAG para el 2045, siendo de 12.99% y 8.29%, respectivamente (4).

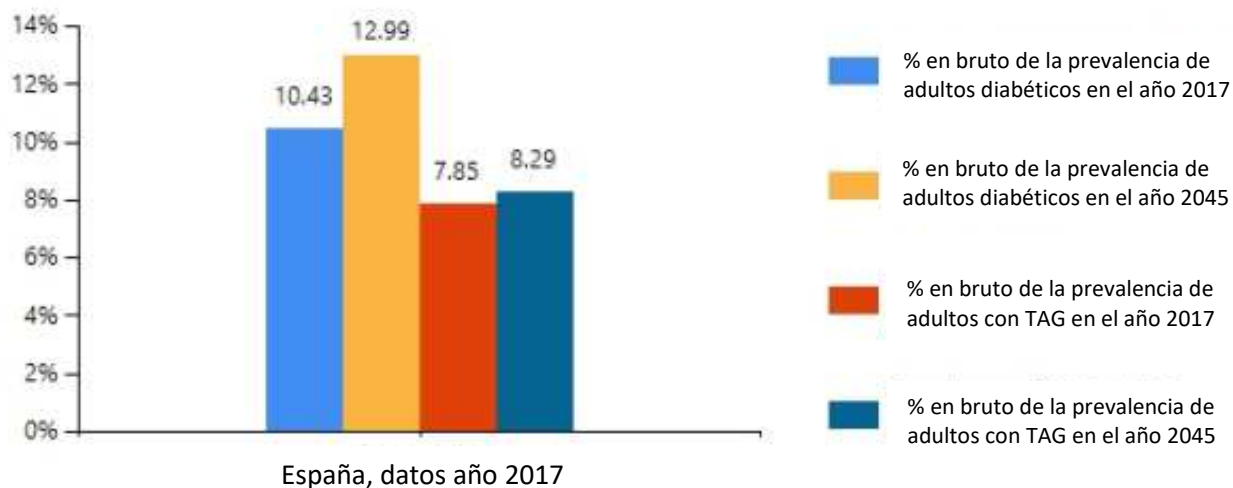


Figura 2: Prevalencia en España de Diabetes y Tolerancia Alterada a Glucosa (TAG) en adultos de 20 a 79 años, en 2017, y predicción del 2045, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF)(4).

Por otra parte, el riesgo de mortalidad entre las personas con diabetes es al menos el doble del descrito para la población no diabética (1,5).

A nivel mundial, podemos ver representado en la figura 3 el número total de muertes, en millones, relacionadas con la DM, en cada uno de los continentes, en el año 2017, en personas con el rango de edad de 20-79 años. El continente con un mayor número de mortalidad es el Pacífico Oeste con 1,3 millones de defunciones, mientras que el continente menos afectado es América del Sur, con un total de 0,2 millones de defunciones. La suma total es de 4 millones de muertes a causa de DM en el año 2017 (4).

En el continente europeo ha habido más de 477.000 muertes a causa de la DM en personas entre 20-79 años (9% del total de defunciones).

1. Introducción

Aproximadamente, se estima que el 32,9% de las mismas se ha producido en personas de edades por debajo de los 60 años, lo que refleja una distribución de la mortalidad, por edades, en la población diabética, pudiendo estar relacionada con la mejora de las tasas de supervivencia debido a la mejora de la asistencia sanitaria de las personas con diabetes en Europa. Hay más muertes debidas a DM en mujeres que en hombres (413.807 vs 279.543 respectivamente). Esto es debido al aumento del número de casos de DM en mujeres (30,8 millones) en relación con el número de casos en hombres (28,8 millones) y al mayor número de mujeres en la población global (350,1 millones) con respecto a la población total de hombres (321,4 millones) (figura 4) (4).

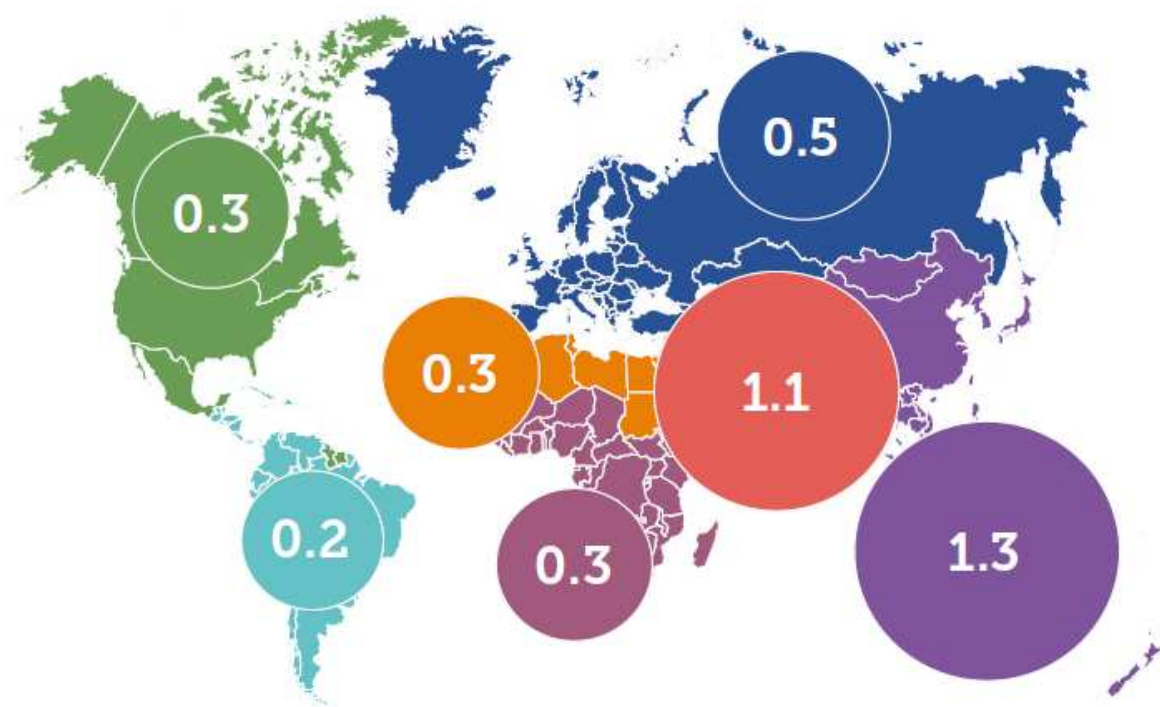


Figura 3: Número de muertes a causa de la DM a nivel mundial, en millones, en adultos de 20 a 79 años, en 2017, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF)(4).

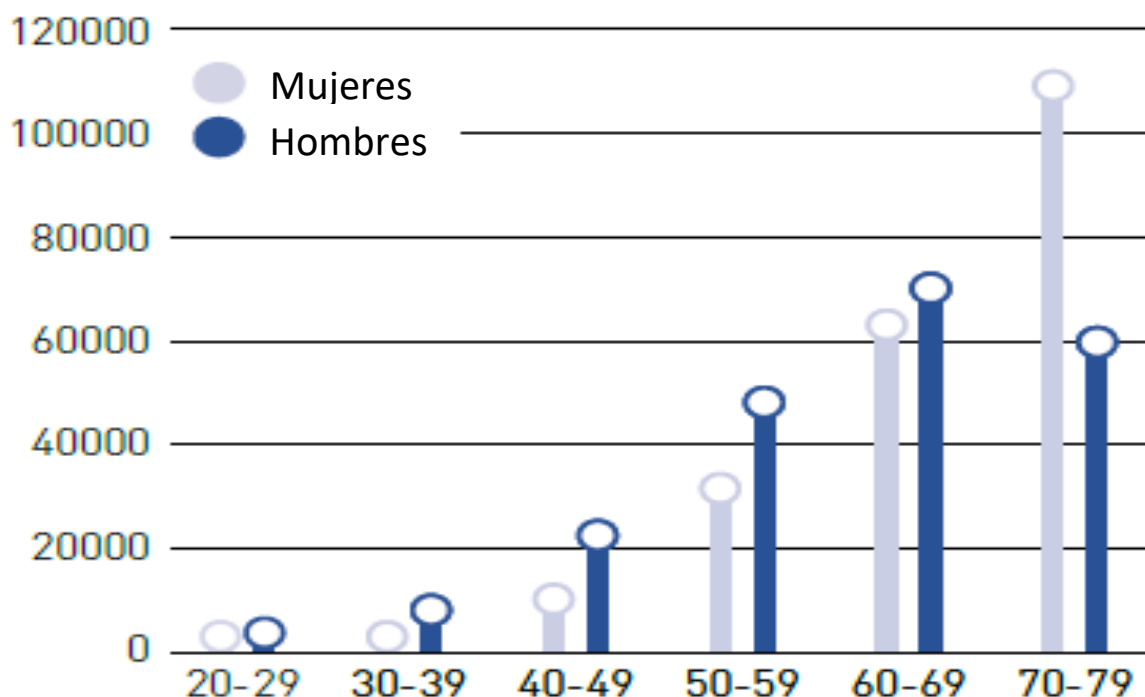


Figura 4: Número de muertes a causa de la DM en Europa, separadas por género y rango de edad comprendida entre 20 a 79 años, en 2017, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF)(4).

Desde el punto de vista económico, el gasto total sanitario a nivel mundial en relación con la DM ha ascendido a 727.000 millones de dólares (727 billones USD) en 2017, según los datos obtenidos por la IDF, cifra que se ha triplicado desde el año 2006 (figura 5) (4).

En Europa, el gasto sanitario total en relación con la DM es de unos 166.000 millones de dólares (166 billones USD) (4). Como se observa en la figura 6, Europa es la segunda zona con mayor gasto sanitario después de América del Norte, con un total del 23% del gasto global (4).

En España, en 2012, se realizó un estudio del coste de la DM1 y DM2 mediante un enfoque de prevalencia, a través del análisis y la revisión de las bases de datos y de la literatura relacionada con el uso de recursos en la DM2. Los costes directos anuales a considerar fueron: hospitalarios (incluyendo la atención ambulatoria), de atención primaria (incluyendo pruebas complementarias y tiras reactivas de automonitorización de glucemia capilar) y farmacológicos. Para los costes no relacionados, sólo se incorporó el sobrecoste. Adicionalmente, se analizó

1. Introducción

el coste de las complicaciones independientemente de la categoría de costes donde se hubieran originado, calculándose un coste directo total anual de la DM de 5.809 millones de euros (8,2% del gasto sanitario total), donde los costes farmacológicos fueron la categoría con mayor peso sobre el coste directo total (2.232 millones de euros (38%), de lo cuales el gasto de los fármacos antidiabéticos fue de 861 millones de euros (15%), seguido por los costes hospitalarios (33%) y el coste de las tiras reactivas de automonitorización de glucemia capilar (118 millones de euros (2%)). El coste total de complicaciones en general fue de 2.143 millones de euros (7).

Por otra parte, en otro estudio realizado en España entre el año 2001 y 2012 para identificar los factores implicados en el gasto sanitario en pacientes con DM2, los resultados obtenidos relacionan el 71,4% del coste directo con las complicaciones de la DM2 (8). Diferentes estudios de costes han establecido que las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus (DM), tanto cardiovasculares como microvasculares, tienen el mayor impacto económico para los sistemas sanitarios (2). Además, diferentes estudios muestran que los costes en los pacientes con DM son mucho más elevados que los de la población general, diferencia que se atribuye al incremento del consumo de recursos hospitalarios por las complicaciones de la enfermedad, al tratamiento farmacológico de la DM y sus complicaciones, así como de otros factores de riesgo asociados, que son más prevalentes en los pacientes con DM2 (2).

Otro grupo de investigación realizó un estudio retrospectivo, durante el año 2011, a partir de la base de datos SIDIAP (Sistema d'Informació per al Desenvolupament de la Investigació en Atenció Primària) en el que se comparan los costes de la atención de los pacientes con DM2 con los de los no diabéticos en los centros de Atención Primaria (AP) del Institut Català de la Salut (ICS), que atiende a un 80 % de la población de Cataluña llamado Coste de la DM2. Además, también se analizan distintos factores que influyen en la composición de los costes en ambos grupos de pacientes, como el sexo, la edad, el control glucémico o la presencia de complicaciones (2).

Se compararon los costes de 126.811 pacientes con DM2 (el 53,5 % varones, con una media de edad de 67,7 años, una media de evolución de la enfermedad de

7,2 años y una hemoglobina glicosilada (HbA1C) media del 7,14 %) con los de 126.811 pacientes sin DM. Un 24,6 % de pacientes diabéticos tenía alguna complicación (el 7,8 % macrovascular, el 5,4 % microvascular y el 11,1 % ambas). El coste anual medio por paciente fue de 3.362,8 euros en los diabéticos y de 2.156,5 euros en los no diabéticos (diferencia de 1.206,3 euros e incremento del 59,9 %). El coste de las hospitalizaciones ascendió a 1.226,6 y 886,4 euros (diferencia de 340,2 euros e incremento del 38,4 %); el de farmacia, 925,0 y 489,2 euros (diferencia de 435,8 euros e incremento del 89,0 %), y el resto, 634,3 y 412,4 euros (diferencia de 222,4 euros e incremento del 54,5 %). Aplicado al conjunto del Estado español (47 millones de habitantes en el año 2011), con una prevalencia similar, el coste adicional sería de aproximadamente unos 3.900 millones de euros anuales (2).

Los costes de la DM representan una proporción muy elevada del total del gasto sanitario español, siendo imprescindible introducir estrategias para reducir así sus complicaciones y los enormes costes humanos y económicos asociados a la enfermedad (7). Las estrategias terapéuticas asociadas a una menor frecuencia de hipoglucemias y a una mejor adherencia y un óptimo control del peso permitirían reducir el coste de la DM2 (8).

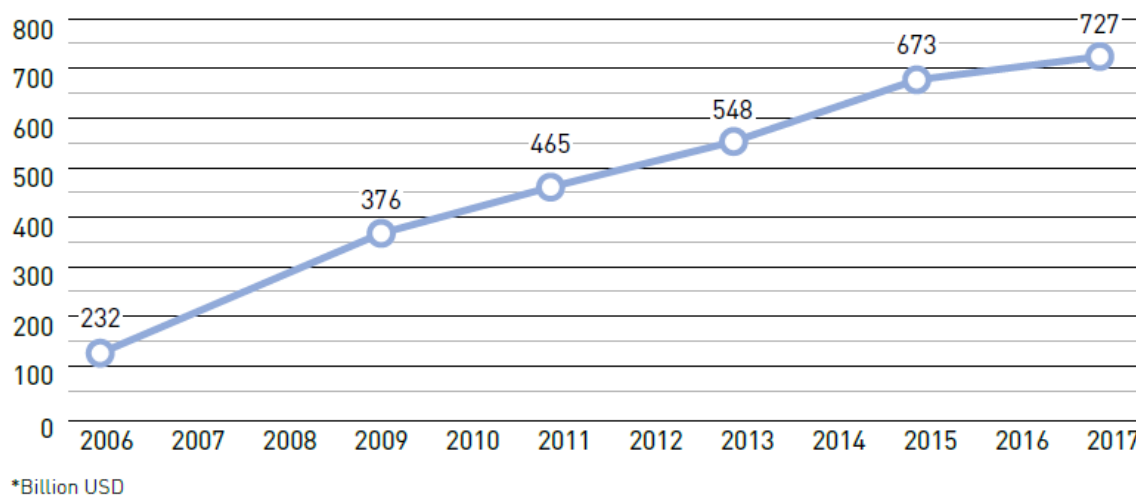


Figura 5: Comparativa del gasto total sanitario a causa de la DM a nivel mundial, en billones (USD), en adultos de 20 a 79 años, entre los años 2006-2017, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF)(4).

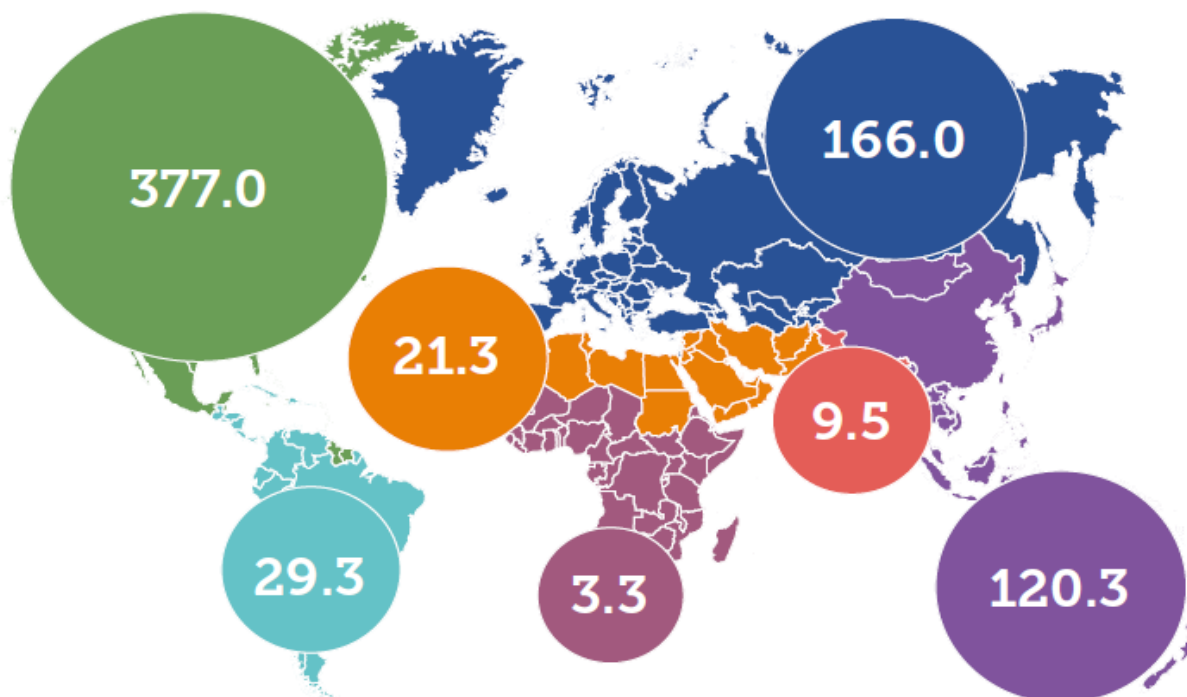


Figura 6: Gasto total sanitario a causa de la DM a nivel mundial, en billones (USD), en adultos de 20 a 79 años, en 2017, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (4).

1.1.2. Patologías asociadas a la DM2 y sus complicaciones

Cuando la diabetes no es tratada correctamente es probable que aparezcan nuevas patologías de manera progresiva. Con el tiempo, la diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, los riñones, los ojos y el sistema nervioso periférico (5). La asociación observada entre riesgo vascular y resistencia a insulina (RI), a menudo denominada síndrome metabólico (SM), ha llevado a pensar que el riesgo cardiovascular aparece precozmente, antes de que se desarrolle la DM2, mientras que la relación estrecha entre hiperglucemia y enfermedad microvascular (retinopatía, nefropatía, neuropatía) indica que este riesgo no se vuelve aparente hasta que aparece una hiperglucemia franca (9). El 50% de las personas con diabetes muere de enfermedades cardiovasculares (principalmente enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares) y el 10-20% de las mismas fallecen de insuficiencia renal (5). El SM es la agrupación de varios factores que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus. Estos factores

son la dislipidemia aterogénica, la hipertensión arterial (HTA) y la hiperinsulinemia, así como un estado proinflamatorio y protrombótico (9,10). Además, el síndrome metabólico presenta hasta ocho veces mayor riesgo de DM2 y está presente en más del 40% de las personas mayores de 50 años (11).

1.1.2.1. Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) constituye la principal causa de muerte en la población española (12) y es la mayor causa de muerte prematura en España y en todo el mundo occidental, contribuyendo de forma sustancial al imparable aumento de los costes de asistencia sanitaria (13). En el 2006 se produjeron un total de 120.760 muertes (55.433 en varones y 65.327 en mujeres), lo que supone el 33% de todas las defunciones (13). En el 2014 descendió ligeramente a un total de 117.393 muertes, lo que supone el 30% de todas las defunciones.

La tendencia temporal en mortalidad ajustada por la edad en ECV se encuentra en descenso en los últimos 40 años (figura 7). Por el contrario, las tasas de morbilidad hospitalaria por ECV casi se han triplicado en España durante ese periodo, aunque mostraron una disminución entre 2003 y 2012 (figura 8) (12). A nivel mundial, la incidencia de infarto de miocardio e ictus se ha reducido con el paso de las décadas, aunque siguen siendo las patologías que más se relacionan con la DM2 (14). En cuanto a la morbilidad hospitalaria, en el 2006, la tasa de enfermedad isquémica del corazón fue de 328 por 100.000 habitantes (464 en los varones y 195 en las mujeres) y la tasa de enfermedad cerebrovascular fue de 261 por 100.000 habitantes (281 en los varones y 241 en las mujeres) (13).

1. Introducción

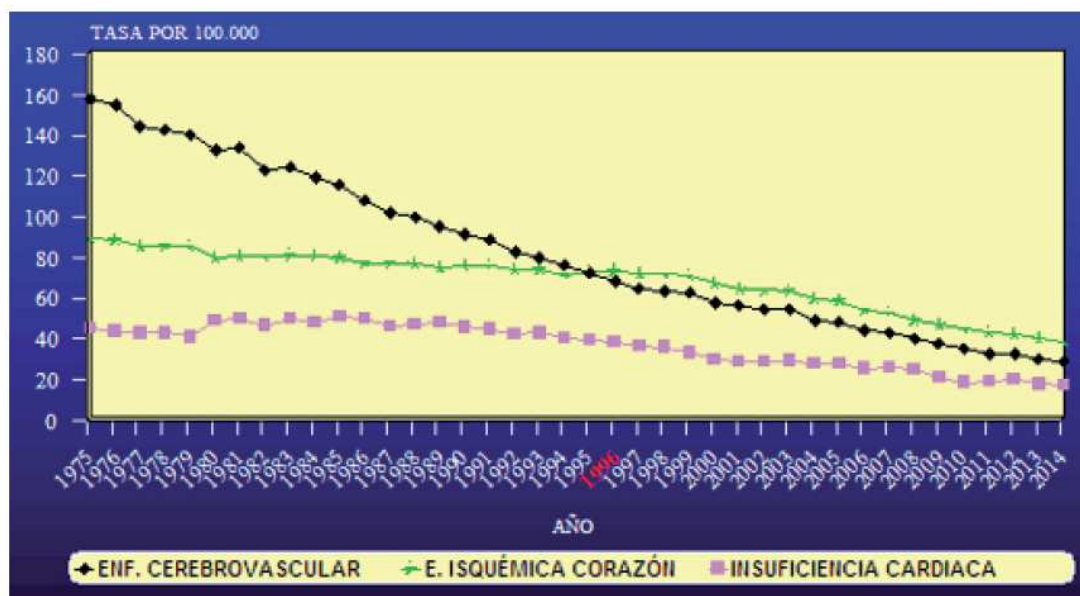


Figura 7: Evolución de la tasa de mortalidad ajustada por edad de la enfermedad cerebrovascular, enfermedad isquémica del corazón e insuficiencia cardíaca en ambos sexos en España en el período 1975-2014 (12).

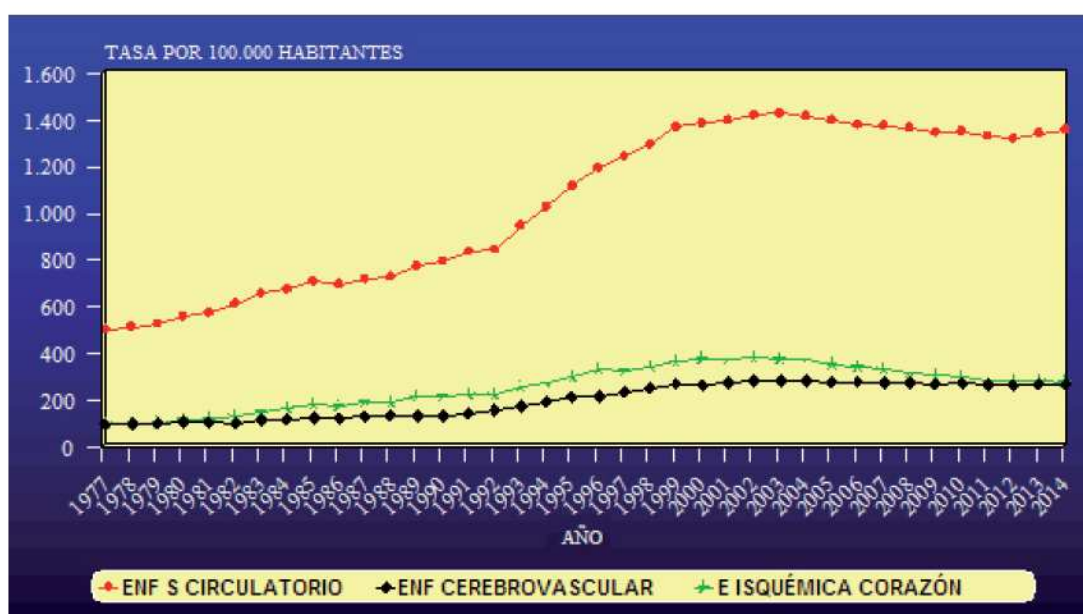


Figura 8: Evolución de la tasa de morbilidad hospitalaria de las enfermedades del sistema circulatorio, enfermedad isquémica del corazón y enfermedad cerebrovascular en ambos sexos en España en el período 1975-2014 (12).

Es frecuente que la insuficiencia cardíaca (IC) y la DM2 coexistan y que cada una de ellas afecte de manera adversa al curso natural de la otra. Los factores de riesgo de IC mas prevalentes, también los son en los pacientes diabéticos, donde la enfermedad coronaria y la hipertensión son los más importantes (9). La prevalencia de IC en la población general, en el año 2004, fue de un 1-4%, y de un 0,3-0,5% en los pacientes que tienen IC y DM2 simultáneamente. Los estudios en poblaciones con IC revelan una prevalencia de DM2 de un 12-30%, que aumenta con la edad. La DM2 es un importante factor independiente de riesgo de IC. En el estudio de Framingham, el riesgo relativo (RR) de IC en los pacientes con DM2 (edad, 45-74 años) fue el doble en varones y seis veces mayor en mujeres. La alta incidencia de IC en pacientes con DM2 también se ha confirmado en el *National Health and Nutrition Examination Survey*, que ha revelado que la DM2 es un factor independiente de riesgo de IC (pacientes diabéticos frente a no diabéticos, RR = 1,85; IC95%, 1,51-2,28) (9).

El objetivo de un estudio publicado en 2015 en el *Lancet*, era investigar y comparar la asociación entre DM2 y el riesgo futuro de 12 de las patologías cardiovasculares de inicio más comunes, en hombres y mujeres. El número total de pacientes consistió en 1.921.260, de los cuales 1.887.062 (98.2%) no tenían DM2 y 34.198 (1.8%) tenían DM2. Las 12 patologías cardiovasculares a evaluar fueron: angina estable, angina inestable, infarto de miocardio, muerte coronaria inesperada, fallo cardíaco, ataque isquémico transitorio, ictus, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracerebral, enfermedad arterial periférica, aneurisma aorta abdominal y arritmia (14). Los resultados obtenidos indicaron que la DM2 está positivamente asociada con enfermedad arterial periférica (RR=2,98), ictus (RR=1,72), angina estable (RR=1,62), fallo cardíaco (RR=1,56) e infarto de miocardio no fatal (RR=1,54), mientras que se ha relacionado de manera inversa con aneurisma de aorta abdominal (RR=0,46) y hemorragia subaracnoidea (RR=0.48), y no se ha asociado con arritmia o muerte cardíaca repentina (14). Se concluyó que el fallo cardíaco y la enfermedad arterial periférica son las patologías de inicio más comunes en pacientes con DM2. También se observó que no había diferencias significativas de género entre las distintas patologías cardiovasculares y DM2, a excepción de un ligero aumento del riesgo de infarto de miocardio no

1. Introducción

mortal en mujeres menores de 60 años con respecto a hombres menores de 60 años (14).

La DM es un factor de riesgo de desarrollo de aterosclerosis en cualquier localización vascular, pero sobre todo de enfermedad isquémica de extremidades inferiores, en la que aumenta el riesgo 2-4 veces, y enfermedad carotídea (9). En la enfermedad arterial de extremidades inferiores en pacientes diabéticos, las obstrucciones vasculares suelen localizarse distalmente, con lesiones típicas en la arteria poplítea o en los vasos de las extremidades inferiores. En una cohorte de 6.880 pacientes de más de 65 años, 1 de cada 5 pacientes tenía enfermedad isquémica de extremidades inferiores, aunque solo el 10% estaba sintomático. La incidencia y la prevalencia de esta patología aumentan con la edad y la duración de la DM. La progresión de la misma puede dar lugar a ulceraciones en los pies, gangrena y, finalmente, amputación de parte de la extremidad afectada (9).

Además, la disglucemia por sí sola puede tener un efecto desfavorable en el miocardio desarrollando una patología conocida como miocardiopatía diabética donde la hiperglucemia de larga duración puede afectar (incluso en ausencia de otros factores de riesgo, como enfermedad coronaria, enfermedad valvular o hipertensión) al tejido miocárdico y aumentar el riesgo de disfunción. Una reducción de la distensibilidad del ventrículo izquierdo (un signo temprano de miocardiopatía diabética) puede detectarse precozmente en el curso de la DM. La coexistencia frecuente de hipertensión y DM hace que sea difícil aislar la contribución del estado glucometabólico a la disfunción diastólica (9).

Un estudio multicéntrico que incluyó a 11.140 pacientes diabéticos ha confirmado que la fibrilación auricular es relativamente común en la DM2 y ha demostrado que cuando la DM2 y la fibrilación auricular coexisten, hay un riesgo notablemente aumentado de muerte por causa cardiovascular, accidente cerebrovascular e IC (9).

1.1.2.2. Enfermedad renal

La DM es un importante factor de riesgo de complicaciones microvasculares renales. En el riñón, la disfunción endotelial y el aumento de la permeabilidad vascular están clínicamente representados por la microalbuminuria, y la oclusión

vascular se corresponde con la disminución progresiva de la función renal medida por la TFG (tasa de filtración glomerular) (9).

En España, en el 2008, el estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica) estimó que el 10% de la población adulta, aproximadamente, sufría de algún grado de enfermedad renal crónica (ERC) (15). En este estudio se ha observado que la frecuencia de ERC en DM2 es muy elevada, del 34,6%, lo que supone que en 1 de cada 3 pacientes la ERC va a incrementar su ya elevado riesgo cardiovascular y renal. Además, se suma otro factor que sabemos que influye en la morbilidad y en el desarrollo de ERC terminal, como es la elevada prevalencia (16,1%) de micro-macroalbuminuria (15). En otros estudios españoles recientes, se ha estimado que el 27,9% de los pacientes con DM2 presentan ERC y que más del 35% presentan microalbuminuria, proteinuria o ERC, puntualizando además que los pacientes diabéticos y con ERC tienen más edad y presentan una mayor morbilidad cardiovascular (enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica o dislipemia) en comparación con la población no diabética con ERC, así como una mayor mortalidad, que en el 49% de los casos es de origen cardiovascular (16). En otro estudio se ha observado que los episodios cardiovasculares constituyen el 75-80% de casos de causa directa o indirecta de mortalidad en pacientes con DM2 (17).

1.1.2.3. Retinopatía diabética

La retinopatía es la complicación microvascular más frecuente de la DM (9). El daño acumulado, a largo plazo, en los pequeños vasos sanguíneos del ojo conduce a la retinopatía diabética, una causa importante de ceguera. Después de 15 años de diabetes, aproximadamente, el 2% de las personas desarrolla ceguera y el 10% desarrolla una discapacidad visual grave (5). Aunque su incidencia ha disminuido lentamente tras la implementación de regímenes terapéuticos intensivos, la retinopatía proliferativa, que pone en riesgo la visión, afecta al 29% de las personas con DM2 (9).

La retinopatía de progresión rápida indica un riesgo cardiovascular aumentado. Asimismo, la combinación de retinopatía y nefropatía predice un

1. Introducción

exceso de morbilidad y mortalidad cardiovascular. En la DM2, la retinopatía avanzada aumenta en más del doble el riesgo de eventos cardiovasculares (9).

1.1.2.4. Neuropatía diabética

La neuropatía diabética afecta hasta al 50% de las personas con diabetes. Aunque muchos problemas diferentes pueden ocurrir como resultado de la neuropatía diabética, los síntomas más comunes son hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y las manos. Combinada con un flujo sanguíneo reducido, la neuropatía de extremidades inferiores aumenta la posibilidad de úlceras en el pie y su posible amputación (5).

Finalmente, un grupo de investigadores ha determinado la prevalencia y la relación del SM con el riesgo cardiovascular según los criterios de la OMS, el *The Third Report National Cholesterol Education Program* (NCEP-ATP III) y la *International Diabetes Federation* (IDF), en una población española de pacientes con DM2. Los resultados muestran que la prevalencia del SM es mayor en pacientes diabéticos sedentarios (OMS=79,3%; NCEP-ATP III=86,2%; IDF=93,9%) que en aquellos que realizan una actividad física moderada (OMS=61,4%; NCEP-ATP III=73,2%; IDF=85,5%; [p<0,001]) y que el porcentaje de pacientes con SM y riesgo cardiovascular moderado/alto es del 38,9% (OMS), 33,6% (NCEP-ATP III) y 30,1% (IDF) (18).

1.2. Caracterización patofisiológica de la DM2

1.2.1. Fisiopatología de la DM2. El continuo disglucémico

Desde el punto de vista clínico, la diabetes engloba una serie de trastornos metabólicos de etiología múltiple que se caracterizan por cursar de forma crónica con hiperglucemia como resultado de la alteración de la acción de la insulina debida a variaciones de su secreción, de su señalización celular o a una combinación de ambos efectos. Existen dos tipos etiológicos principales de diabetes mellitus, la DM tipo 1 (DM1) y la DM tipo 2 (DM2) (19). En ambos casos, el desarrollo de la enfermedad se atribuye a una combinación de factores genéticos

predisponentes y una serie de factores ambientales que actuarían como desencadenantes (1).

La DM2 es la forma más prevalente de diabetes y se origina por resistencia periférica a la insulina, en la cual tienen lugar defectos en la señalización celular a insulina en tejidos periféricos (hígado, músculo esquelético y adiposo) que pueden manifestarse con distintos grados. Al final, el aumento progresivo de la RI, que en un inicio promueve un aumento en la producción pancreática de insulina, termina provocando el fallo generalizado y apoptosis en la propia célula β pancreática (19). La mayoría de los casos nuevos de DM2 ocurren en un contexto de estilo de vida occidental, dietas ricas en grasas y poco ejercicio físico, lo que conduce a aumento de la obesidad, RI, hiperinsulinemia compensadora y, finalmente, insuficiencia de las células beta y DM2 (9). La DM2 está típicamente asociada con obesidad, estilo de vida sedentario, edad avanzada, historia familiar de DM y la etnia, por lo tanto, la susceptibilidad de padecer DM2 está regulada, en parte, por factores genéticos (20). Los trastornos del metabolismo de la glucosa, glucosa alterada en ayunas (GAA) y tolerancia alterada a glucosa (TAG), a menudo conocidas como prediabetes, reflejan la historia natural de la progresión desde la normoglucemia a la DM2 (9).

El estudio DECODE (*Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis Of Diagnostic Criteria in Europe*) ha aportado información sobre los trastornos del metabolismo de la glucosa en la población europea (figura 9)(9). Se puede observar cómo la glucosa media plasmática a las 2 horas post-sobrecarga (2hGP) aumenta especialmente después de los 50 años de edad. Las mujeres tienen una concentración media de 2hGP superior a los varones, una diferencia que se hace más pronunciada a partir de los 70 años de edad. Sin embargo, la glucosa plasmática en ayunas (GPA), aumenta sólo ligeramente con la edad (9). La DM2 no produce síntomas específicos durante muchos años, lo que explica que aproximadamente la mitad de los casos de DM2 queden sin diagnóstico (9).

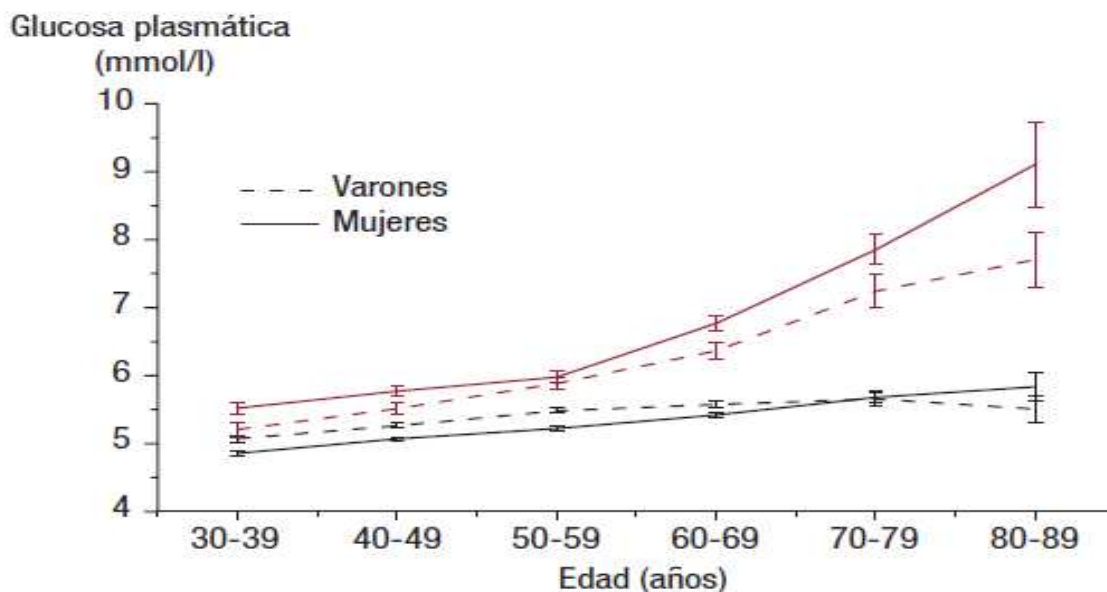


Figura 9: Concentración media de glucosa plasmática en ayunas (GPA) y a las 2h postcarga (2hGP), en 13 cohortes poblacionales europeas incluidas en el estudio DECODE. GPA: las dos líneas inferiores, color negro; 2hGP: las dos líneas superiores, color rojo; Intervalos de confianza del 95% en barras verticales (9).

Son varios los mecanismos fisiopatológicos en que se apoya el concepto de continuo disglucémico a través del espectro de GAA, TAG, DM y ECV (9). La DM2 se caracteriza por un largo tiempo de RI, hiperinsulinemia compensadora y grados variables de elevación de la glucosa plasmática, asociados con aumento del riesgo cardiovascular y de aparición de enfermedad macrovascular antes del diagnóstico y la aparición de enfermedad microvascular tras el diagnóstico (figura 10) (9). Por lo tanto, padecer DM2 lleva consigo el riesgo de tener complicaciones microvasculares que conducen a amputaciones de extremidades, fallo renal, ceguera, así como otros desórdenes como hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular, dislipemia e infecciones (20). La hiperglucemia crónica induce trastornos bioquímicos que causan glicosilaciones proteicas y sobreproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), lo que conduce a la aparición de daño vascular y, como consecuencia, a la activación de sistemas de reparación/crecimiento específico tisular. Las características fenotípicas del daño microvascular en la DM son la oclusión vascular progresiva y el aumento de la permeabilidad vascular (9).

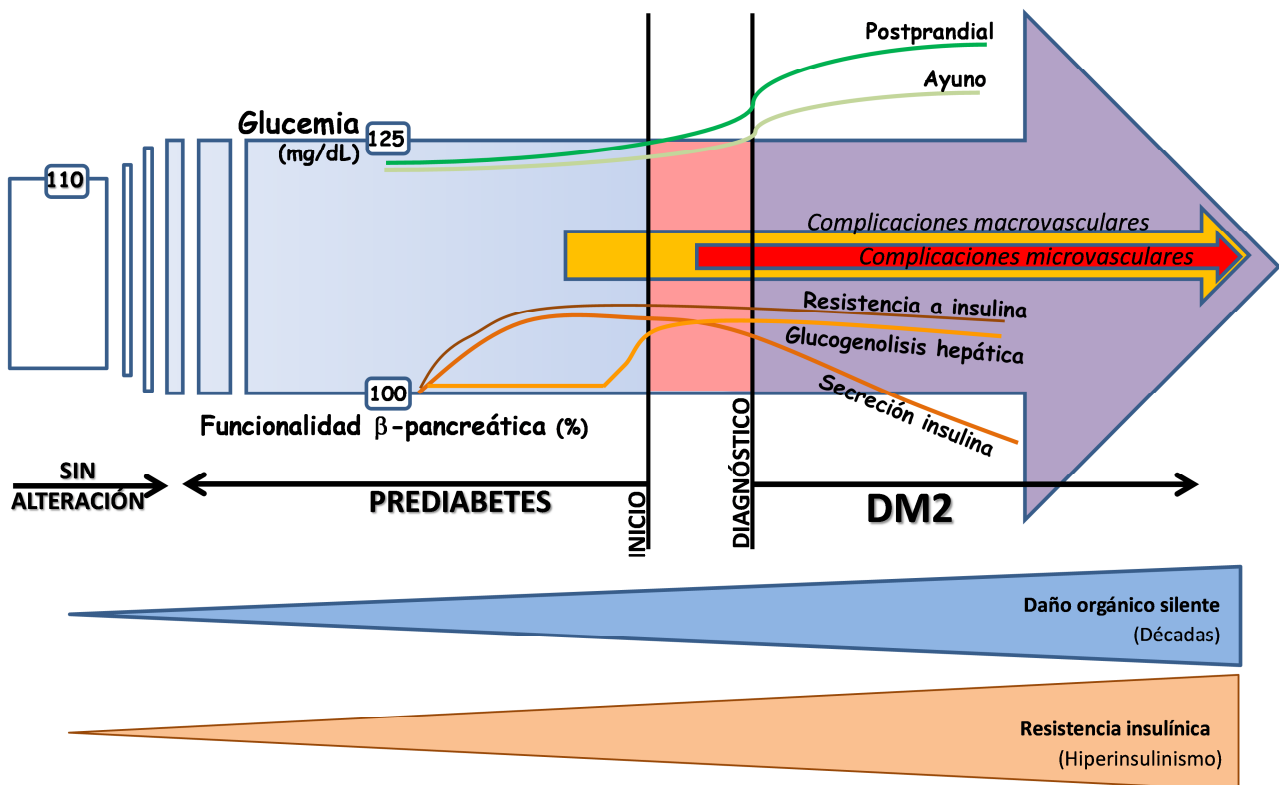


Figura 10: Continuo disglucémico y ECV. (Imagen modificada) (9).

La aparición de ECV en sujetos con RI es un proceso progresivo, caracterizado por disfunción endotelial precoz e inflamación vascular que conducen a la movilización de monocitos, la formación de células espumosas y el posterior desarrollo de estrías grasas. A lo largo de muchos años, estos fenómenos favorecen la formación de placas ateroscleróticas, las cuales, en presencia de un entorno inflamatorio aumentado, se convierten en placas inestables y se rompen, lo que promueve la formación de trombos oclusivos. Los ateromas de las personas con DM tienen más lípidos, cambios inflamatorios y trombos que los de aquellas sin DM. Estos cambios ocurren en un periodo de 20-30 años y se producen en paralelo a una serie de anomalías moleculares observadas en sujetos con RI no tratada y DM2 (9). Es la punta del iceberg de un conjunto de factores de riesgo cardiovascular descritos como SM (1).

1.2.2. Factores de riesgo de desarrollo de DM2 y comorbilidades asociadas

Los factores de riesgo relacionados con la DM2 se pueden dividir en no modificables y modificables. Dentro de los factores de riesgo no modificables se incluyen el grupo étnico, los antecedentes familiares, los factores genéticos, la edad, el género y algunas patologías de aparición temporal o tardía, como la DM gestacional o el síndrome de ovario poliquístico. En cuanto a los factores de riesgo modificables encontramos la dieta, la actividad física, el sobrepeso y la obesidad, la HTA y el HDL bajo, entre otros (10).

1.2.2.1. Factores no modificables

Existen grupos geográficos/étnicos en los que la DM2 es más prevalente, siendo hasta seis veces más prevalente en personas de ascendencia del sur de Asia y hasta tres veces más prevalente entre las personas de origen africano y africano-caribeño (1,5). En los grupos indígenas de Norteamérica, islas del Pacífico y Australia la prevalencia de DM2 alcanza hasta un 20 a 30%, mientras que en África sólo llega a ser alrededor de un 3,1% (10).

Las personas con antecedentes familiares de DM2 tienen un riesgo mucho mayor de desarrollar la enfermedad (1,5). En individuos con uno o más parientes de primer grado (padres, hermanos o hijos) diagnosticados con DM2, se estima un aumento de 2 a 6 veces el riesgo de padecer DM2 (21). Aquellos individuos con un padre diabético tienen un 40% de posibilidad de desarrollar la enfermedad y si ambos padres son diabéticos el riesgo se eleva a un 70%. Además, existe una concordancia del 70% en gemelos idénticos (10), que ha demostrado que existe una firme relación en la herencia genética de la DM2 (21). En un estudio realizado por *Johansen et al.* elaboraron un modelo de predicción de riesgo de DM2 en el que, al incluir los antecedentes familiares, consiguieron identificar un 23% más de casos con DM2 sin diagnosticar, que sin incluir los antecedentes familiares (21). Para determinar el papel que juegan los antecedentes familiares en el desarrollo de DM2, se realizó un estudio transversal donde se estudiaron 162 hijos, de padre o madre con DM2, de 30 a 35 años de edad con factores de riesgo asociados a DM2. Se realizó glucosa plasmática de ayuno y a aquellos con GAA se les realizó curva de tolerancia a la glucosa. El 90,2% presentaron normoglucemia y el 9,8% presentaron

prediabetes, de los cuales, el 43,8% obtuvieron resultados de TAG. La media del IMC en el grupo con GAA y TAG fue de 27,8, y en el grupo de normoglucémicos de 26,6 (22). La historia familiar tiene la capacidad adicional de revelar tanto factores genéticos compartidos como factores ambientales que las familias tienden a compartir, como la actividad física y las conductas dietéticas (21).

Otro factor de riesgo importante es la edad, ya que cuanto mayor es un individuo, mayor es el riesgo de diabetes, sin embargo, la DM2 está aumentando en todos los grupos de edad, incluso en niños y adolescentes (5), debido a un aumento de obesidad, inactividad física y dietas pobres (4). En un estudio iraní, en el 2013, realizado por *Khashayar et al.* reclutaron a 5.738 estudiantes con edad $14,7 \pm 2,4$ años, de los cuales al 2.5% se les diagnosticó SM, con una mayor prevalencia dentro del grupo de estudiantes con sobrepeso y obesidad (23).

En general, la prevalencia de DM2 es mayor en mujeres que en hombres (10). Además, las mujeres que han padecido DM gestacional (DMG) tienen un mayor riesgo de desarrollar DM2 en un futuro próximo. Los hijos de mujeres con DMG poseen un mayor riesgo de obesidad y de un metabolismo anormal de la glucosa durante la infancia y/o la vida adulta (5,10). Por otra parte, el bajo peso al nacer se asocia con un mayor riesgo de desarrollar DM2 (5,10,24).

Como es de suponer, los factores de riesgo no modificables no se pueden alterar, por lo que nos van a permitir evaluar desde qué situación parte un individuo con respecto al riesgo de padecer o no DM2 en un futuro.

1.2.2.2. Factores modificables

La dieta es muy importante, ya que comer altos niveles de hidratos de carbono refinados y grasas saturadas, así como no ingerir suficientes frutas, verduras y fibra, contribuye al aumento de peso, lo que aumenta el riesgo de diabetes (5,10,25).

La actividad física regular es importante, con tan sólo 30 minutos de ejercicio moderado al día, cinco días a la semana es suficiente para promover la buena salud y reducir la posibilidad de desarrollar DM2 (5,10).

1. Introducción

El sobrepeso y la obesidad (IMC de más de 25 kg/m²) representan alrededor del 65–80% de los casos nuevos de DM2. El riesgo de padecerla está en función de la edad de inicio, la duración de la obesidad y del aumento de peso durante la vida adulta. Las personas con sobrepeso tienen un riesgo relativo más bajo que las personas obesas, sin embargo, la fracción de la enfermedad atribuible al sobrepeso puede ser tan alta, si no más, que la obesidad. Esto demuestra la importancia de prevenir el aumento de peso en todos los rangos (5,25).

Los factores ambientales pueden desencadenar cambios dinámicos en la expresión de genes y la síntesis de proteínas que se producen independientemente de la secuencia del ADN, lo que sugiere que los enfoques postgenómicos pueden proporcionar instantáneas más detalladas y oportunas de los procesos etiológicos que vinculan la diabetes y la ECV (26).

Los factores de riesgo modificables, como cabe esperar, son sobre los que podemos actuar para prevenir o retrasar la aparición de la DM2. La progresión y la gravedad de la DM2, en cualquier individuo, depende de la combinación de los factores de riesgo, tanto genéticos como no genéticos, que exhibe (21).

El grupo de *Langenberg et al.*, en 2013, realizó un análisis de la incidencia acumulada de DM2 mediante la estratificación de los factores de riesgo incluidos en el estilo de vida y los cuartiles de la puntuación genética, en el que mostraron un fuerte efecto de los factores modificables sobre el riesgo absoluto de DM2, en comparación con los obtenidos de la puntuación genética. Este resultado fue más evidente para la obesidad, factor que más interesa modificar en la DM2 (27,28). En otro estudio realizado por *Mühlenbruch et al.*, en 2013, sobre la predicción del riesgo de DM2 mediante la utilización de variantes genéticas y otros factores de riesgo, no se obtuvo un valor mayor de riesgo con la información genética respecto a la utilización de marcadores estándar (no invasivos y metabólicos). El estudio sugiere que la inclusión de variantes genéticas en la predicción del riesgo de diabetes podría ser útil, sobre todo, para subgrupos con factores de riesgo ya manifiestos, como edad avanzada, antecedentes familiares y obesidad (29).

Otro factor de riesgo, que se quedaría fuera de esta clasificación, son los determinantes socioeconómicos. La desventaja socioeconómica contribuye al desarrollo de la diabetes y sus complicaciones a través del acceso desigual al

tratamiento y las condiciones ambientales que promueven elecciones de hábitos poco saludables, como peores dietas y menor actividad física, lo que favorece la obesidad. Casi el 80% de los casos de diabetes ocurren en países con bajas rentas per cápita. Sin embargo, también se encuentran altos índices de diabetes entre los grupos de personas con bajos ingresos en muchos países de elevada renta per cápita. Por ejemplo, la morbilidad por complicaciones de la diabetes es tres veces más alta entre las personas más pobres del Reino Unido que entre las más ricas (1,5,25).

Las patologías asociadas con los factores de riesgo descritos están relacionadas con trastornos cardiovasculares, HTA, dislipemias y SM, entre otras. En individuos con estas patologías y en pacientes con enfermedad coronaria establecida, el control de los distintos factores de riesgo es pobre, especialmente en relación con la obesidad, el tabaco, la presión arterial y más aún en diabéticos. La grasa intra-abdominal (grasa visceral), es un órgano endocrino metabólicamente activo que induce hiperinsulinemia y RI, dislipemia, HTA, y un aumento de la secreción de ácidos grasos libres, mecanismos a través de los que aumenta el riesgo cardiovascular (RCV) (13). El aumento del peso corporal está asociado a un aumento de la morbilidad y mortalidad total y por ECV, mediado en parte por el aumento de la presión arterial y el colesterol, la reducción del HDL y el aumento de riesgo de diabetes (13). Los pacientes con SM tienen habitualmente un RCV alto (13). Se ha establecido asociación entre marcadores de inflamación, como la interleucina-6 (IL-6), y el desarrollo de DM2 con la insuficiencia cardíaca (13).

El daño renal, el RCV y la DM2 comparten factores de riesgo. El riesgo de ECV aumenta progresivamente desde la microalbuminuria con TFG aparentemente preservadas hasta la enfermedad renal terminal. Estimar la TFG es relevante para la población general aparentemente sana y para los que tienen HTA, DM, edad avanzada, ECV e IC. La insuficiencia renal (IR) se asocia a HTA, hiperlipemia, SM, ácido úrico y homocisteína elevados y anemia. Los pacientes con daño renal requieren un control especialmente intenso de los factores de riesgo (13).

Los estudios epidemiológicos de diabetes sugieren que los factores de riesgo modificables explican aproximadamente el 80% del aumento en la prevalencia (5). Con respecto a la prevención del desarrollo de DM2, muchos de los

1. Introducción

riesgos para la salud asociados con el aumento de peso corporal aparecen primero en niños y jóvenes. Para ayudar a prevenir la DM2 y sus complicaciones, las personas de todas las edades deben alcanzar y mantener un peso corporal saludable, mantenerse físicamente activas, seguir una dieta saludable y evitar el consumo de tabaco (5). En el estudio de *Aguila et al.*, en 2012, se evaluaron los resultados de aplicar, o no, un programa de ejercicio físico en personas diabéticas con predominancia de sobrepeso y con una edad promedio de 49 años. Se obtuvo una disminución de los valores de glucemia, colesterol y triglicéridos a las 6 y a las 12 semanas con respecto a la determinación inicial en el grupo con actividad física y, también, una reducción significativa de la presión arterial sistólica y diastólica. Por lo tanto, un programa de ejercicios moderados favorece el control metabólico y los factores de riesgo existentes (30).

Las personas con TAG o GAA se encuentran en la etapa intermedia entre la normalidad y la diabetes y tienen un alto riesgo de desarrollar DM2. Este riesgo puede reducirse drásticamente mediante la modificación intensiva del estilo de vida y la intervención farmacológica (5). Los malos hábitos dietéticos y un estilo de vida sedentario tienen gran importancia en el desarrollo de la DM2. Tal como se ha revisado en las guías europeas basadas en la evidencia sobre prevención de la DM2, los estudios clínicos aleatorizados demuestran que una modificación en el estilo de vida, basada en una pérdida de peso moderada y un aumento de la actividad física, previene o retrasa la progresión en sujetos de alto riesgo con TAG (9).

En la DM2, el consejo dietético, la reducción de peso y la actividad física deben ser el primer paso del tratamiento, seguido de tratamiento farmacológico (hipoglucemiantes orales, e insulina si es necesario) dirigido a la consecución de un buen control de la glucemia. Los objetivos terapéuticos recomendados para la DM2 se basan en la glucemia y en la hemoglobina glicosilada (HbA1c) (13).

Los hábitos de vida tienen una fuerte influencia en todos los componentes del SM, por lo que en el manejo de éste se debe hacer especial énfasis en su modificación, particularmente en la reducción del peso y el aumento de la actividad física, con un seguimiento profesional cercano. En caso de presión arterial alta, dislipemia e hiperglucemia (en el rango de diabetes) puede ser necesario añadir

tratamiento farmacológico adicional, tal y como se recomienda en la Guía Europea de Prevención Cardiovascular de 2008 (13).

Por otro lado, el diagnóstico precoz de la enfermedad isquémica de extremidades inferiores en los pacientes diabéticos es importante para prevenir la progresión, así como para predecir el riesgo cardiovascular total. Una medida objetiva de la enfermedad isquémica de extremidades inferiores es el índice tobillo-brazo (ITB), que se calcula dividiendo el valor de presión arterial sistólica en la tibia posterior o dorsal del pie por la presión arterial sistólica braquial. Un índice $<0,9$ indica enfermedad isquémica de extremidades inferiores, especialmente en presencia de síntomas o hallazgos clínicos como soplos o ausencia de pulsos. Un ITB $<0,8$ indica enfermedad arterial periférica, independientemente de los síntomas. Un ITB $> 1,40$ indica vasos poco compresibles como resultado de la rigidez de la pared arterial (calcinosis de la media), lo que puede impedir la correcta estimación de la presión en la arteria, incluso en caso de isquemia grave de las extremidades (9). Si se practica correctamente la prevención, la eliminación de conductas de riesgo podría evitar hasta un 80% de la ECV (12).

Para el diagnóstico y seguimiento de la ECV y la DM se puede utilizar el algoritmo que incluye la guía de práctica clínica de la *European Society of Cardiology* (ESC) sobre diabetes, prediabetes y enfermedad cardiovascular (figura 11) (9).

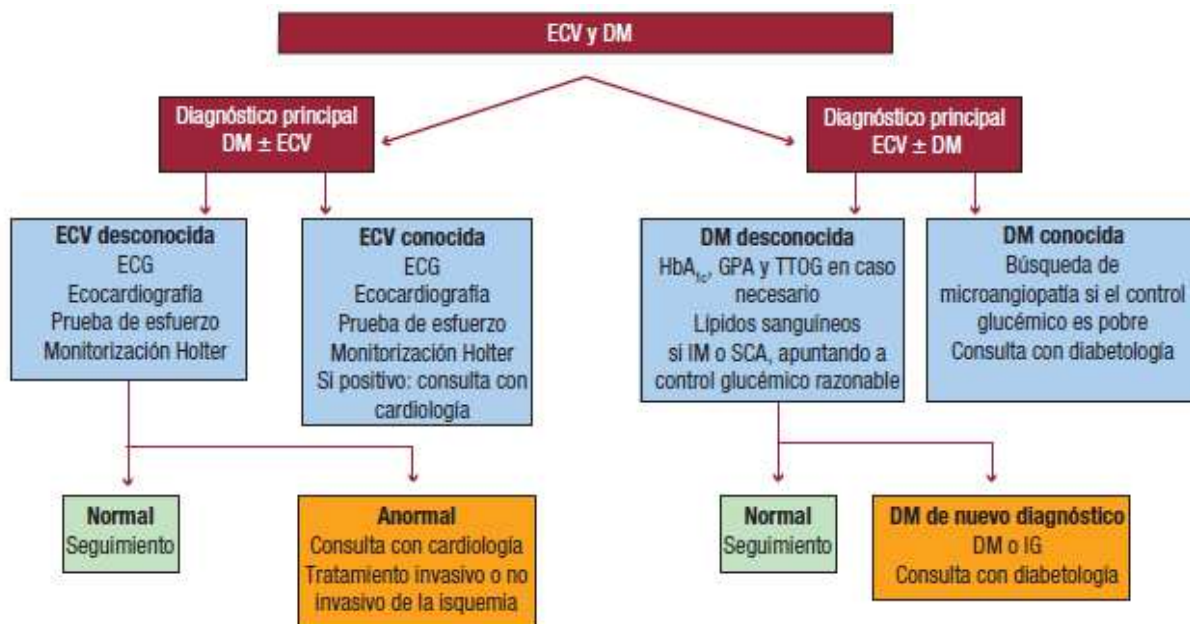


Figura 11: Algoritmo para el diagnóstico y manejo de la ECV en pacientes con DM. ECG: electrocardiograma; GPA: Glucosa Plasmática en Ayunas; HbA₂: Hemoglobina Glicosilada; IG: Intolerancia a la Glucosa; IM: Infarto de Miocardio; SCA: Síndrome Coronario Agudo; TTOG: Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (9).

La grave carga de la enfermedad asociada con la DM2 ha llevado a un énfasis en la identificación temprana de las personas con alto riesgo para que las estrategias de manejo e intervención puedan implementarse eficazmente antes de que comience la progresión de la enfermedad. Los factores clínicos como el IMC, una medida de sobrepeso y obesidad, la edad y los antecedentes familiares se usan con mayor frecuencia para predecir el riesgo de DM2 y las estrategias de tratamiento inicialmente tienden a ser las mismas para la mayoría de los individuos. Sin embargo, la complejidad subyacente al riesgo individual, la progresión de la enfermedad y la respuesta terapéutica pueden limitar la efectividad de la predicción del riesgo estandarizada y los enfoques terapéuticos (9). A pesar de los nuevos fármacos para el tratamiento de la DM2, la evidencia científica y las guías nacionales e internacionales disponibles para poder conseguir los objetivos de control glucémico, éste es complejo y todavía insuficiente. Como principales motivos implicados en la no consecución de objetivos en el paciente

con DM2, se barajan la inercia terapéutica (presente en un 40% en nuestro medio en pacientes con HbA1c > 7%), el incumplimiento terapéutico por parte del paciente, los problemas inherentes al sistema sanitario y la historia natural de la enfermedad (17).

1.2.3. Mecanismos celulares implicados en la génesis del continuo disglucémico

En la mayoría de los casos de DM2 la herencia es poligénica y en presencia de otros factores como la obesidad determinarán el desarrollo posterior de la enfermedad (1). La *Genome Wide Association* (GWAS) ha realizado un catálogo con los *loci* genéticos replicados en el que se incluye más de 100 variantes. Sin embargo, estas variantes genéticas sólo explican una fracción inesperadamente pequeña (<15%) de la heredabilidad estimada de la DM2 y su inclusión sólo mejora marginalmente el rendimiento de los modelos predictivos previamente existentes (31). Además, se ha identificado alrededor de 60 *loci* (SNPs) susceptibles para el desarrollo de la DM2, lo que nos proporciona una mayor información para poder entender las bases de la patología relacionada con la intolerancia a la glucosa y la subsecuente DM (21,32,33), estando muchos de ellos relacionados con la biología de las células β pancreáticas, lo que subraya la importancia de su disfunción en la patogénesis de la DM2 (24).

En el excesivo estado nutricional encontrado en la obesidad, en la hiperglicemia y en la hiperlipidemia se desarrolla un aumento de la carga metabólica conjuntamente con la inherente RI y la inflamación crónica. La respuesta de los islotes pancreáticos difiere entre individuos, teniendo en cuenta la susceptibilidad genética e incluyendo el estrés inflamatorio, estrés del retículo endoplásmico, estrés metabólico y oxidativo (p.e glucotoxicidad, lipotoxicidad...), estrés amiloide y la pérdida de la integridad celular. Si no se tratan y aumentan en el tiempo, van a promover la disfunción de las células β y por último la pérdida de su masa junto con la posible desdiferenciación, marcando el inicio de la DM2 (figura 12) (24).

Prácticamente toda la glucosa que entra en las células β pancreáticas se oxida vía glicolisis y fosforilación oxidativa mitocondrial, generando ATP (respuesta a un aumento de la glucosa extracelular). Esto conduce al cierre de los canales de

1. Introducción

ATP-K en las células β , lo que desencadena la despolarización de la membrana, la actividad eléctrica dependiente de Ca^{2+} , el flujo de Ca^{2+} y la liberación de insulina. Por tanto, la secreción de insulina está regulada por el estado bioenergético mitocondrial (34,35). Muy poca cantidad se metaboliza a lactato debido a la baja actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y la supresión de la expresión del transportador de monocarboxilato (MCT1) (Slc16a1) en las células β . Debido a la circulación de lactato y piruvato, los genes de LDH y MCT1 se encuentran inactivos, evitando la estimulación de la secreción de insulina durante el ejercicio. Mutaciones en el promotor de MCT1 que aumentan su expresión en células β humanas, conducen a la hipoglucemia inducida por el ejercicio (35).

En un estudio, realizado por *Ashcroft et al.* observaron que el almacenamiento de glucógeno en las células β pancreáticas produce su disfunción y la reducción de su masa, en DM2. Se produce un aumento de la expresión de glucógeno sintasa (disminución de glucógeno fosforilasa) cuando aumentan los niveles de glucosa, desencadenando la acumulación de glucógeno. Además, se producen cambios en la expresión de los genes metabólicos de las células β a consecuencia de la hiperglucemia crónica: se reduce la expresión de las enzimas en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, y aumenta la expresión de las enzimas glucolíticas, gluconeogénicas y del metabolismo de glucógeno (35).

Otros estudios realizados con islotes pancreáticos humanos, junto con estudios in vitro de células β clonales, sugieren que la hiperglucemia altera la metilación del ADN en la región de los genes PDX1 (*Pancreatic And Duodenal Homeobox 1*) e INS (insulina). Estos CpG-SNP están asociados con la metilación diferencial del ADN, la expresión génica, los eventos de corte y empalme alternativos (*splicing*) y la secreción de hormonas en los islotes pancreáticos, lo que sugiere fuertes interacciones genético-epigenéticas (24).

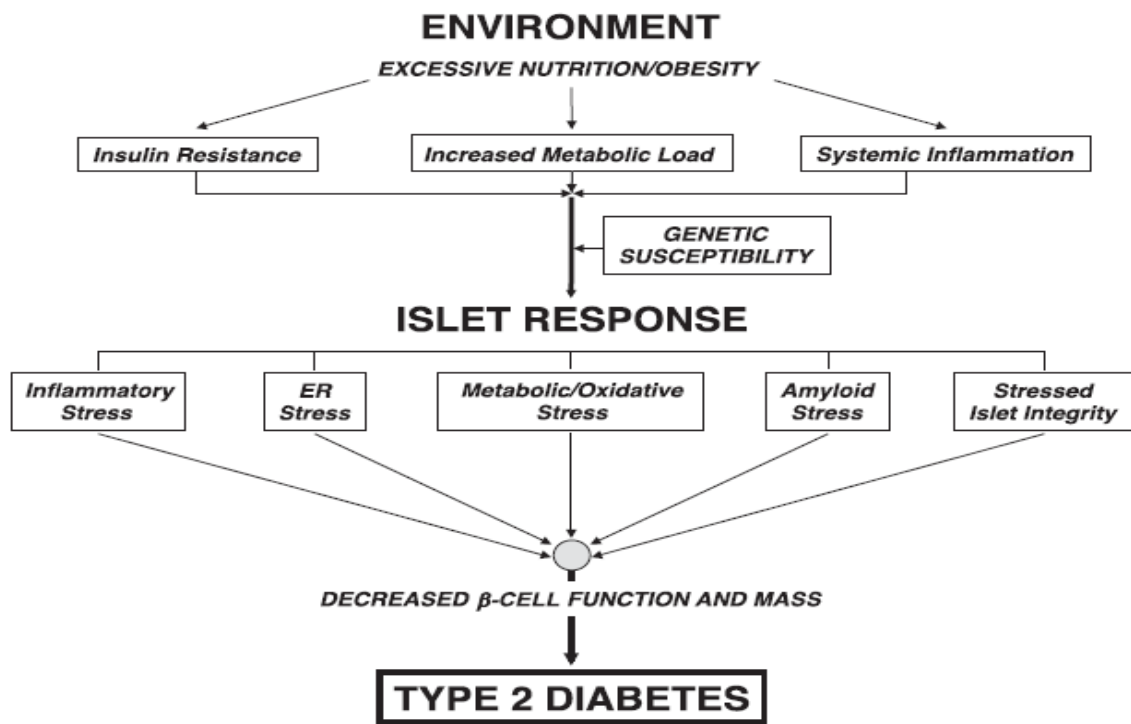


Figura 12: Factores de estrés en la célula β en la patología de DM2. ER: Retículo Endoplásmico (siglas en inglés) (24).

La mayoría de las variaciones genéticas identificadas aumentan aproximadamente entre el 10% y el 45% el riesgo de DM2, además los individuos que tienen copias homocigóticas de ciertos alelos tienen un riesgo más elevado que los no portadores (21). Otros estudios realizados por la GWAS también han descrito algunos genes ligados a la obesidad y a la ECV, enfermedades conectadas metabólicamente a la DM2. Los sistemas de integración de datos moleculares específicos de tejido han revelado algunos procesos que relacionan tejido y enfermedad, como la relación del metabolismo lipídico centrado en hígado y las rutas de transporte en el caso de ECV y obesidad, la relación de la fosforilación oxidativa específica de hígado y tejido adiposo, oxidación de ácidos grasos, señalización de PPAR (receptor de activación de factores de proliferación peroxisomal) y diferenciación de células adiposas para obesidad, RI y DM2, y el ciclo de regulación celular específico de islote pancreático para DM2 (36).

Recientemente, en el estudio sobre una población de gemelos, realizado por grupo de *Heinonen et al.* se observó que los gemelos obesos presentaban una deficiente regulación global de la expresión de las vías oxidativas mitocondriales, conjuntamente con una baja regulación de ADNmt, del sistema de traducción

dependiente de ADNmt y de los niveles de proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, en comparación con sus respectivos gemelos no obesos. Además, los resultados mostraron una reducción en la oxidación AG, en la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos y en el ciclo Krebs, que se correlacionó de manera inversa con la RI, la adiposidad y las citoquinas inflamatorias (34,37).

Las rutas metabólicas que se encuentran afectadas por la insulina coinciden con algunas de las descritas anteriormente, siendo las más conocidas el metabolismo de la glucosa, el de los aminoácidos, el de los lípidos y el ciclo de Krebs. Dentro de las vías metabólicas hasta hace poco desconocidas, se encuentran la de las prostaglandinas, el ácido araquidónico, los leucotrienos, así como las de ciertos neurotransmisores, nucleótidos y los mecanismos de la respuesta inflamatoria (38).

Todas las rutas metabólicas descritas, se encuentran relacionadas unas con otras. Las señales celulares responden a factores ambientales, además de genéticos, y controlan la homeostasis energética a diferentes niveles celulares.

Las alteraciones endocrino-metabólicas asociadas al síndrome metabólico implican la participación de factores ambientales y genéticos, los cuales llevan a un desequilibrio en el metabolismo energético celular, particularmente en la degradación y utilización de lípidos y carbohidratos. Se han identificado varios sistemas claves en el control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular: la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), PPARs, la leptina y la adiponectina (39).

1.2.3.1. Vía de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*)

La AMPK es un sensor del estado nutricional y metabólico de la célula. Puede activarse por ejercicio, estrés osmótico, isquemia e hipoxia, al fosforilarse la subunidad catalítica. A nivel cardíaco, la activación de la AMPK participa en el reclutamiento de los transportadores de glucosa en el sarcolema y en la activación de la glucólisis al fosforilar a la fosfofructocinasa-2, la cual produce fructosa-2,6-bifostato para activar a la fosfofructocinasa I, uno de los pasos limitantes de la vía glucolítica. Además, la AMPK está relacionada con la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos al fosforilar a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), con lo cual

disminuye el contenido de malonil-CoA, el principal inhibidor fisiológico de la degradación de ácidos grasos, liberando así la inhibición de la carnitín palmitoil-transferasa I (CPTI), con lo cual se intensifica la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (34,39). El grupo de investigación de *Rovira-Llopis et al.* observó que en el músculo esquelético de pacientes con RI se produce la inhibición de la función mitocondrial y un aumento de la peroxidación lipídica (34).

Las hormonas secretadas por el tejido adiposo, leptina y adiponectina, activan a la AMPK tanto en el tejido adiposo como en los tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético e hígado, aumentando el consumo de energía. Por el contrario, en el hipotálamo, la AMPK es inhibida por leptina e insulina, hormonas que normalmente suprimen la ingesta alimenticia. A su vez, la activación de AMPK, promueve la activación de los PPARs- γ que promueven la expresión de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos (figura 13)(39).

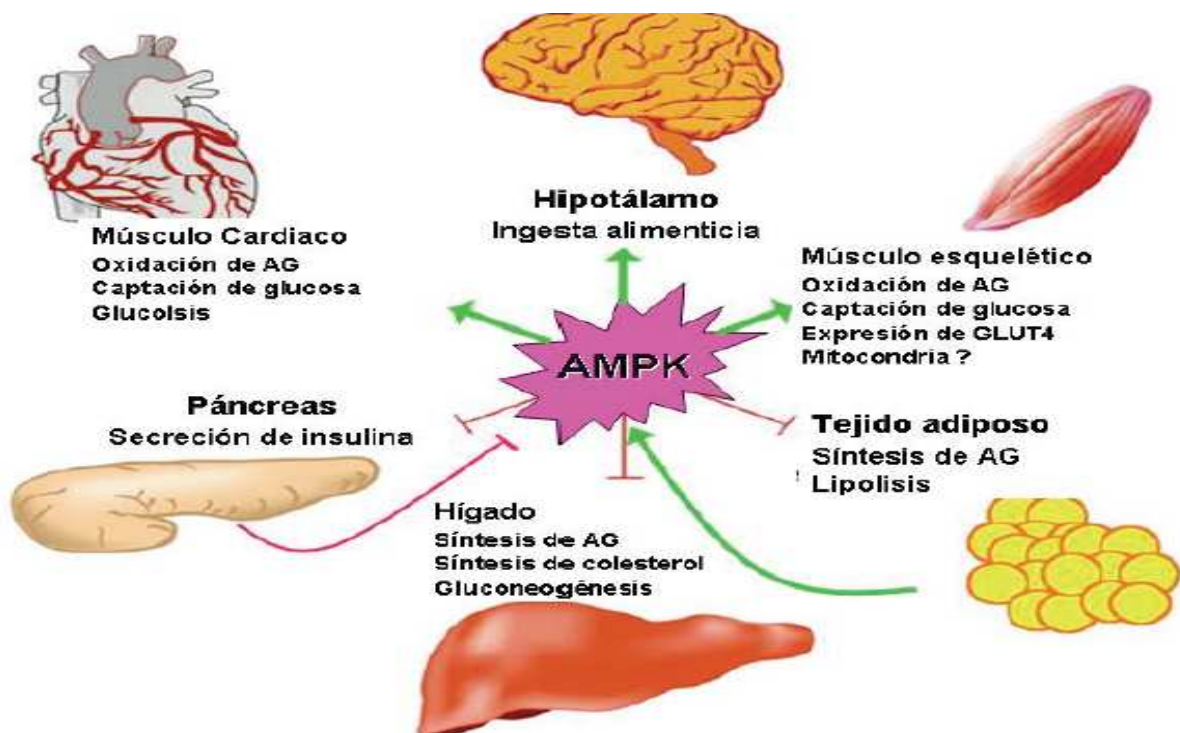


Figura 13: AMPK como sensor de estrés metabólico y nutricional. AG: ácidos grasos; GLUT4: Transportador de glucosa 4; AMPK: proteína cinasa dependiente de AMP. Las flechas en verde indican activación y las flechas en rosa inhibición (39).

1.2.3.2. Vía de los PPARs (*Peroxisome proliferator activated receptors*)

Los PPARs pertenecen a una amplia familia de receptores nucleares activados de la proliferación de peroxisomas, que actúan como activadores de la transcripción. Los PPARs controlan la expresión de los genes relacionados con la homeostasis de la glucosa y de los lípidos, así como de las respuestas inflamatorias. La modificación de la expresión de los PPARs está ligada a la progresión de enfermedades como la obesidad, la DM2, la ECV, el cáncer, la HTA o la inflamación crónica (40). Los PPAR- α se expresan principalmente en el hígado, en músculo esquelético, en el riñón y en menor grado en el corazón. Los PPAR- γ se expresan principalmente en el tejido adiposo, mientras que los PPAR- δ se expresan prácticamente en todos los tejidos. A nivel molecular, se ha propuesto que la activación farmacológica de los PPAR- γ en células de tejido adiposo mejora su capacidad de almacenar lípidos, lo que disminuye la liberación de ácidos grasos libres y la acumulación de triacilgliceroles en sangre y en músculo, con lo que mejora la respuesta a insulina en estos tejidos. Existe un polimorfismo del gen de PPAR- γ que confiere resistencia a desarrollar DM2. Los portadores de este polimorfismo también presentan niveles elevados de adiponectina, mientras que aquéllos que no son portadores presentan niveles bajos (39).

1.2.3.3. Vía de la adiponectina

La adiponectina se encuentra disminuida en pacientes obesos, con RI, en DM2 o con alguna dislipidemia. La expresión de la adiponectina se incrementa por los agonistas de los PPARs, mientras que el TNF- α y la IL-6 la inhiben (39). Por otro lado, la acumulación de macrófagos que tiene lugar en el tejido adiposo de los obesos se ha reconocido recientemente como uno de los procesos esenciales de la inflamación metabólica y la RI. Además, en la RI los macrófagos aumentan la expresión de la forma oxidada del receptor *scavenger* tipo B (SR-B) de las LDL y promueven la formación de células espumosas y aterosclerosis. Estos cambios se pueden revertir por la activación de PPAR- γ , que aumenta la señalización de la insulina en los macrófagos (figura 14) (9).

En el mismo sentido, *Halvorsen et al.* postularon la hipótesis de la implicación de la activación de rutas de inflamación en la patogénesis de la DM2, concretamente la implicación de la superfamilia TNF-14 (LIGHT/TNFSF14). Los resultados obtenidos implicaban un aumento significativo de niveles plasmáticos de LIGHT/TNFSF14 en el grupo con DM2 con respecto al grupo sano, sugiriendo la posible contribución de LIGHT/TNFSF14 en la progresión de DM2 mediante la disminución de la secreción de insulina de los islotes pancreáticos y su participación en la inflamación a nivel vascular y procesos aterogénicos (41).

1.2.3.4. Vía de la leptina

A nivel genético, se ha identificado el gen de la leptina como el factor causante de obesidad y DM2. La leptina es sintetizada principalmente por el tejido adiposo y su sobreexpresión en células de este tejido reduce la expresión de ACC, enzima clave en la síntesis de ácidos grasos. La leptina también puede inhibir la lipogénesis en hígado, islotes pancreáticos y en tejido adiposo. En otros tejidos, como el músculo liso y cardíaco, la leptina inhibe la lipogénesis y estimula la oxidación de ácidos grasos. Este mecanismo involucra la estimulación directa de la AMPK, la cual al fosforilarse inhibe a la ACC (figura 14) (39).

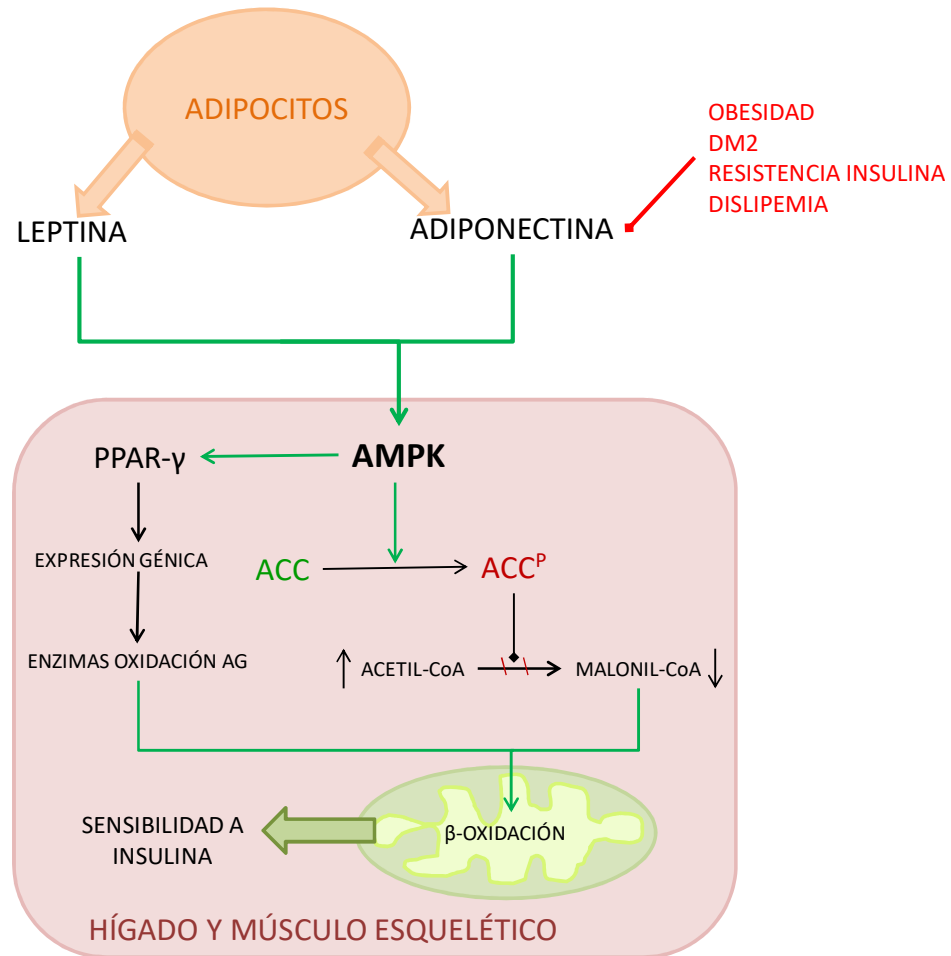


Figura 14: Regulación de la oxidación de ácidos grasos mediada por el tejido adiposo a través de la leptina y adiponectina. (Imagen modificada) (39).

1.2.3.5. Visión integrada de los mecanismos celulares conducentes a la disglucemia

El punto de regulación entre la síntesis y la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos representa un punto estratégico para el tratamiento de desórdenes metabólicos como la obesidad, la diabetes y el SM (39).

Por otra parte, para comprender la fisiopatología de la DM2, a nivel metabólico, es necesario hacer referencia a 4 aspectos fundamentales: *a)* El hecho anatómico, por el que los vasos arteriales grandes y pequeños se ven involucrados en un proceso aterotrombótico que conduce a la enfermedad vascular generalizada (infarto de miocardio, ictus, pie diabético, neuropatía diabética, ceguera e insuficiencia renal crónica progresiva e irreversible); *b)* la base bioquímica, en la que una serie de factores, como la glicosilación no enzimática de proteínas específicas, las vías metabólicas alternativas de los polioles por las que se genera

sorbitol a partir de la aldosa reductasa y los aumentos de diacilglicerol y proteincinasa C (PKC), se transducen en señales que modifican estructural y funcionalmente el endotelio, que es el punto por donde el proceso aterotrombótico se inicia y se mantiene; c) los trastornos procoaguladores, que incrementan la adhesividad y agregabilidad plaquetaria, lo que aumenta la hipercoagulabilidad y disminuye la fibrinólisis, y d) el complejo factor inflamatorio, en el que intervienen numerosos componentes humorales y celulares (42).

La RI tiene un papel importante en la fisiopatología de la DM2 y la ECV, y tanto los factores genéticos como los ambientales facilitan su desarrollo. Más del 90% de las personas con DM2 son obesas y la liberación de ácidos grasos libres (AGL), debida a la lipólisis, y citocinas desde el tejido adiposo disminuye la sensibilidad a la insulina. El aumento de la liberación de AGL aumenta la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), además de una disminución de la degradación de apolipoproteína B-100 (ApoB) y un aumento de la lipogénesis (9). En el músculo esquelético y el tejido adiposo, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducida por los AGL impide la activación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y de la señalización por fosfatidilinositol 3-cinasa/protein-cinasa B (PI3K/Akt), lo que produce una regulación a la baja del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) sensible a la insulina (figura 15) (9).

En la DM2 y el SM, estos cambios conducen a un perfil lipídico caracterizado por una concentración elevada de triglicéridos (TG), una baja concentración de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), un aumento de lipoproteínas residuales y una síntesis de ApoB y partículas de LDL pequeñas y densas, que desempeñan un papel importante en la aterogénesis. En pacientes con DM2, la dislipemia aterogénica es un predictor independiente del riesgo cardiovascular, más fuerte que la concentración elevada aislada de TG o la concentración baja de cHDL (figura 15) (9).

En el grupo de investigación de *Zhao et al.*, realizaron un estudio multiétnico para evaluar si pacientes con DM2 y enfermedad coronaria compartían la misma etiología genética. Evaluaron las variaciones genéticas de todo el genoma de 265.678 pacientes con DM2 y de 260.365 con enfermedad coronaria y demostraron que genéticamente existe un riesgo de padecer DM2 que también

1. Introducción

confiere riesgo de padecer enfermedad coronaria. A su vez, observaron la asociación regional para múltiples SNP (por ejemplo, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2^a* (CDKN2A) / 2B o apolipoproteína E (APOE)). En particular, la asociación entre SNP APOE, DM2 y enfermedad coronaria resultó controvertida, ya que, como se había visto en otros estudios, las variantes genéticas del *locus* APOE se asocian con aumento de lípidos y enfermedad coronaria, pero en el estudio realizado por *Zhao et al.* observaron que estas variables de riesgo de DM2 se asociaban con una disminución del riesgo de enfermedad coronaria y disminución de LDL y un tamaño reducido de partículas LDL. Sin embargo, estas observaciones son consistentes con estudios recientes que indican que la reducción en los niveles de LDL, un factor de riesgo importante de enfermedad coronaria, puede conferir un mayor riesgo de DM2. Además, se ha demostrado que las variantes genéticas en el gen PCSK9, que disminuyen los niveles de LDL, se asocian con un mayor riesgo de DM2, mayor concentración de glucosa en ayunas, mayor peso corporal y mayor relación cintura-cadera. Estos resultados sugieren que LDL puede representar una vía, del pequeño subconjunto de las existentes, que muestran asociaciones opuestas para estos dos resultados (43).

En otra línea, los trastornos metabólicos como la obesidad, la RI y la DM2 están relacionados con la miocardiopatía diabética que conduce a la IC (9,44). En pacientes con DM2, la disminución de la sensibilidad a la insulina predispone a una alteración de la función y la estructura miocárdicas y explica la prevalencia aumentada de la IC en esta población (9). La cardiomiopatía se caracteriza inicialmente por hipertrofia de los cardiomiocitos, seguida de disfunción mitocondrial y fibrosis, ambas agravadas por la angiotensina (44). Los mecanismos fisiopatológicos incluyen la acumulación de productos de glicosilación avanzada, formación de colágeno y fibrosis intersticial, que conducen a una alteración de la homeostasis del calcio y deficiencias en la señalización miocárdica dependiente de insulina, que aumentan la rigidez miocárdica y reducen la distensibilidad. La RI disminuye la contractilidad miocárdica debido a una reducción del flujo del Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L y del intercambio inverso $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La alteración de la vía de señalización de PI3K/Akt, consecutiva a la hiperinsulinemia crónica, tiene un papel esencial en la disfunción cardíaca de la DM2. La disminución

inducida por AGL de la vía de señalización de PI3K impide la activación de Akt y la fosforilación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) lo que produce una disminución de la síntesis de NO, disfunción endotelial y remodelado vascular (aumento del grosor intimomedial), importantes predictores de ECV (9). La evidencia respalda el concepto de que la hiperglucemia disminuye aún más la disponibilidad del NO producido en el endotelio y afecta a la función endotelial por diversos mecanismos, muchos de ellos relacionados con el exceso de producción de ROS (figura15) (9).

Junto con la RI, la hiperglucemia contribuye a las anomalías cardíacas funcionales y estructurales a través de la acumulación de ROS mitocondriales, señalización por *Advanced glycation end products/ Receptor Advanced glycation end products* (AGE/RAGE) y flujo de hexosamina. La activación de las vías de señalización mediadas por ROS afecta a la circulación coronaria y conduce al desarrollo de hipertrofia miocárdica y fibrosis con rigidez ventricular y disfunción de las cavidades (figura15) (9).

En el grupo de investigación de *Waldman et al.*, observaron que la restricción calórica es cardioprotectora en modelos animales con enfermedades cardíacas, debido a su actividad catabólica y a la activación de la expresión de genes adaptativos. Plantearon la hipótesis de que, en el corazón diabético, este efecto involucra defensas antioxidantes y está mediado por SIRT1 y el coactivador transcripcional PGC-1 α (coactivador PPAR) y llegaron a la evidencia de los efectos cardioprotectores de la restricción calórica que operan a través de SIRT1 y PGC-1 α , disminuyendo así el estrés oxidativo, la fibrosis y la inflamación, sugiriendo que el aumento de los niveles de SIRT1 y PGC-1 α ofrece nuevos enfoques terapéuticos para la protección del corazón diabético (44).

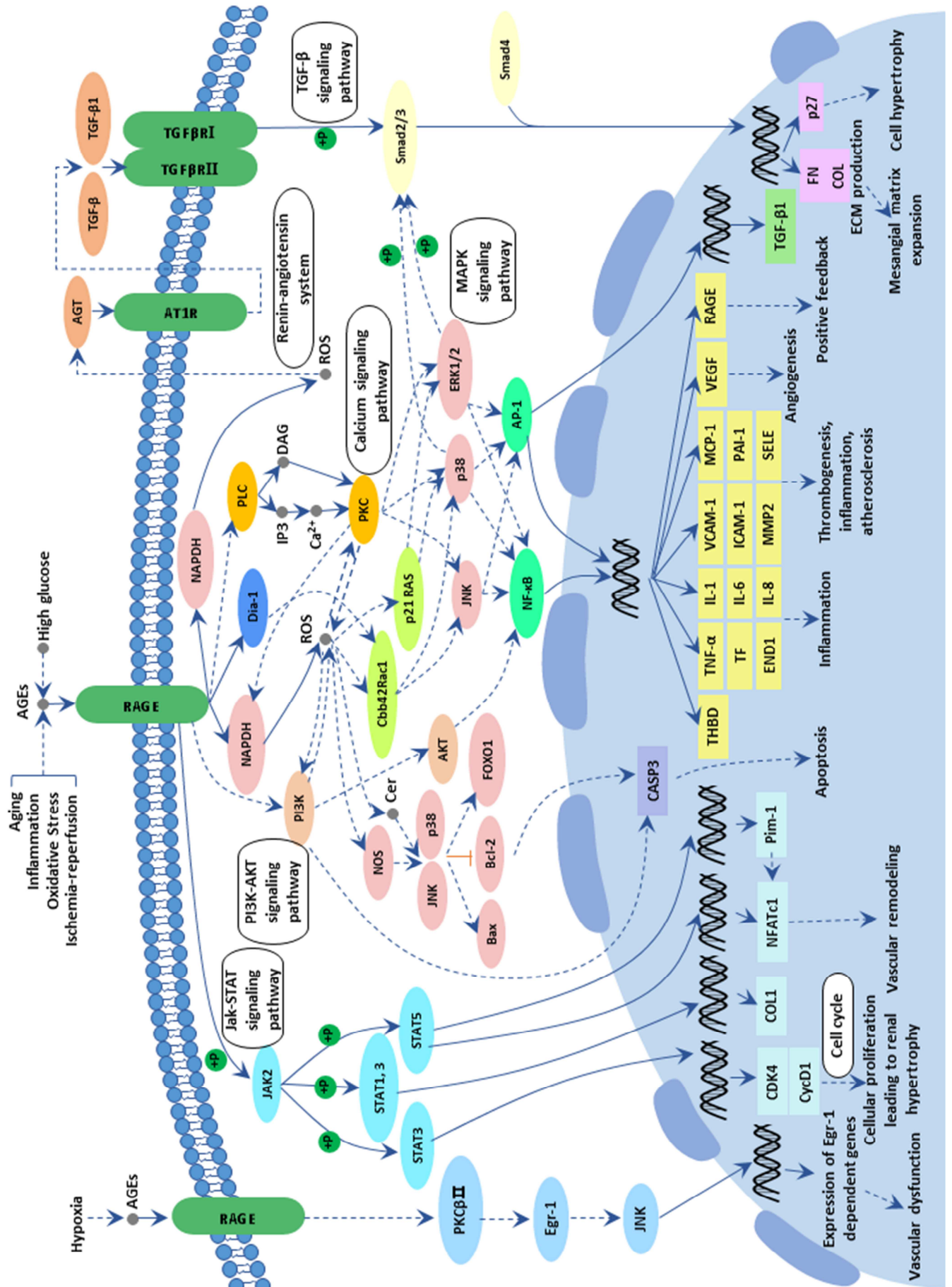
Por tanto, la hiperglucemia y la DM2 están directamente relacionadas con la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y bajos niveles de ATP, lo que genera un cambio *a posteriori* en el estado redox y la homeostasis celular y desencadena una disfunción mitocondrial, ya que las mitocondrias son una de las principales fuentes de ROS y de producción de ATP (34). El deterioro mitocondrial también puede contribuir al desarrollo de RI dependiente de la edad. La biogénesis de las mitocondrias contribuye a regular el balance energético, y se cree que una

1. Introducción

mayor producción de ROS por la cadena de transporte de electrones, en condiciones de hiperglucemia, exacerba la alteración de las vías metabólicas, lo que conduce a complicaciones microvasculares (nefropatía, retinopatía y neuropatía) y complicaciones macrovasculares (ictus e isquemia de miocardio), incluso después de que se normalice la concentración de glucosa (9,34). Los cambios epigenéticos derivados de los ROS están especialmente involucrados en este proceso (9).

En pacientes con DM2, niveles altos de glucosa pueden inducir la oxidación de ésta, generando así piruvato y NADH, y liberando las ROS del complejo mitocondrial I y III. En estas condiciones, se activan diferentes sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) o la proteína de desacoplamiento 1 (UCP-1), para prevenir la producción de ROS e inhibir la formación de productos finales de glicosilación avanzada o la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) (figura 15), impidiendo así que se produzca un estado proinflamatorio crónico (9,34).

Según el grupo de *Sharma et al.*, la hormesis mitocondrial en DM2 implica una reducción de la producción de ROS y una reducción de la síntesis de ATP en diferentes tejidos en respuesta a niveles altos de glucosa o en respuesta al exceso de ingesta de nutrientes, lo que constituye una respuesta compensatoria a la sobrenutrición. Este efecto puede activar sirtuina 1/3 (SIRT1/3), AMPK y PGC-1 α , restaurando así la función mitocondrial y aumentando la sensibilidad a la insulina en las células β , el hígado y el músculo, lo que, a su vez, evita complicaciones vasculares (34). En situaciones de estrés metabólico y oxidativo se pueden inactivar los factores clave de transcripción de las células β , las cuales dejan de responder temporalmente a la glucosa y almacenan cantidades anormales de insulina. Además, debido a que las células β carecen de ciertas enzimas antioxidantes que eliminan las ROS, el aumento de su producción puede promover la disfunción e incluso la apoptosis (24).



1. Introducción

Figura 15: Rutas metabólicas AGE/RAGE. En la imagen se observa la implicación de algunas de las rutas descritas como PI3K/Akt, NOS y NF- κ B. AGEs: Advanced glycation end products; AGT: angiotensin II; AT1R: Type-1 angiotensin II receptor; AP-1: transcription factor activator protein-1; AKT: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; Bax: Apoptosis regulator protein; Bcl-2: Apoptosis regulator protein; CASP3: Caspase-3; Cbb42Rac1: CDK4: Cyclin-dependent kinase 4; COL1: Collagen alpha-1; DAG: Diacylglycerol; Dia-1: Protein diaphanous homolog 1; Egr-1: Early growth response protein 1; END1: Endothelin-1; ERK1/2: extracellular signal-regulated protein kinase; FN: Fibronectin; FOXO1: Forkhead box protein O1; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; IL-1, 6, 8: Interleukin-1, 6, 8; IP3: Inositol trisphosphate; JAK2: Tyrosine-protein kinase 2; JNK: c-Jun N-terminal kinases; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1; MMP2: Matrix Metalloproteinase 2; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1; NF- κ B: Nuclear factor-kappa-beta; NOS: Nitric oxide synthase; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; PI3K: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase; Pim-1: Serine/threonine-protein kinase pim-1; PKC: protein kinase C; PLC: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase; p21:cyclin-dependent kinase inhibitor; p27: cyclin-dependent kinase inhibitor; p38: mitogen-activated protein kinase; RAGE: Advanced glycosylation end product-specific receptor; ROS: Reactive oxygen species; SELE: E-selectin; Smad: mothers against decapentaplegic homolog; STAT: signal transducer and activator of transcription; TGF β 1: Transforming growth factor beta 1; TGF β R: Transforming growth factor beta receptor; THBD: Thrombomodulin; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; VCAM-1: vascular cell adhesion protein 1 ; VEGF: Vascular endothelial growth factor (45).

Como ya hemos visto, la cadena mitocondrial de transporte electrónico es una de las primeras dianas de la hiperglucemia, lo que produce un aumento neto de la formación de anión superóxido (O^{2-}) donde, además, se produce un incremento adicional de la producción de O^{2-} debido a la formación de un círculo vicioso secundario a la activación inducida por ROS de PKC. La activación de la PKC por la glucosa induce un aumento de la expresión de la oxidasa de NADPH, del adaptador mitocondrial p66Shc y de la ciclooxigenasa 2 (COX2), así como de la producción de tromboxano, y una disminución de la liberación de NO (figura 16) (9). Además, en los pacientes con DM2, la RI y la hiperglucemia contribuyen a la patogenia de un estado protrombotico caracterizado por un aumento de la concentración de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), factores VII y XII y fibrinógeno, y una reducción del activador de plasminógeno tisular (figura 16). Entre los factores que contribuyen al aumento del riesgo de eventos coronarios en la DM, la hiperreactividad plaquetaria tiene una importante relevancia (9).

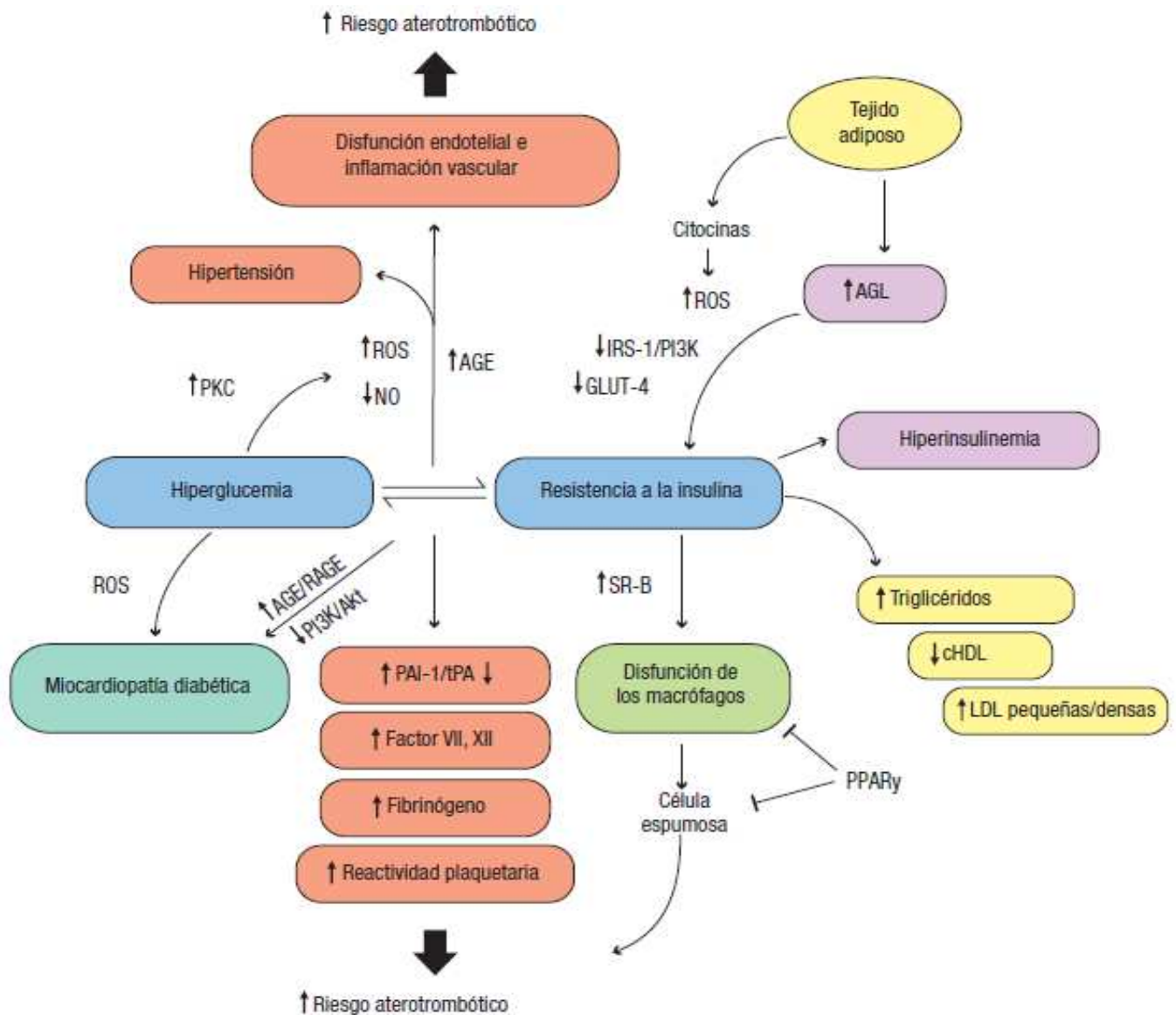


Figura 16: Relación entre la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. AGE: productos glicosilación avanzada; AGL: ácidos grasos libres; APT: activador de plasminógeno tisular; cHDL: colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad; GLUT-4: transportador 4 de glucosa; LDL: partículas de lipoproteínas de baja densidad; NO: óxido nítrico; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno; PI3K: cinasas del fosfatidilinositol 3; PKC: proteincinasa C; PPAR γ : receptor gamma activado por proliferadores de peroxisoma; RAGE: receptor de productos avanzaos de glicosilación; ROS: especies reactivas de oxígeno; SR-B: receptor *scavenger* tipo B (9).

1.2.4. Heterogeneidad fenotípica y necesidad de mejores marcadores

Existe una gran variabilidad genotípica y, por lo tanto, fenotípica en los individuos que desarrollan DM2. Como ya sabemos, los factores genéticos desempeñan un papel importante en el riesgo, la aparición, la gravedad y las complicaciones posteriores de la DM2. En general, el conocimiento actual sobre la contribución de los factores genómicos a la DM2 refuerza el concepto de que es una enfermedad compleja que puede ser diferente en cada persona y que la predicción de riesgo y el tratamiento son excepcionalmente difíciles para los profesionales de la salud (21).

Nos encontramos con un gran abanico de actuación que se regirá en función de la situación en la que se encuentre el paciente, encontrándonos desde la importancia de enfoques universales dirigidos a la intervención en el estilo de vida (27) hasta el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en los distintos mecanismos involucrados en la DM2 y en las patologías subyacentes, como podría ser la inhibición de enzimas clave involucradas en el daño vascular inducido por hiperglucemia o la activación de vías de señalización que mejoren la sensibilidad a la insulina (9).

Los efectos de la edad avanzada, las comorbilidades y los problemas asociados con cada grupo específico indican la necesidad de enfocar el riesgo individualizadamente, permitiendo al paciente tener un papel importante en el manejo de su propia enfermedad (9).

En este conjunto de patologías multifactoriales nos encontramos con la necesidad de nuevos marcadores bioquímicos, junto con la utilización de nuevas tecnologías, que nos permitan el diagnóstico precoz y la selección de individuos según su estado fisiopatológico, para establecer unas dianas terapéuticas concretas en cada individuo y escapar, de esta forma, de la progresión de la enfermedad, ayudando al personal sanitario a establecer unas estrategias personalizadas y evitando el incremento de las comorbilidades, además del incremento del gasto sanitario.

1.3. Medicina personalizada: Metabolómica

1.3.1. Fundamentos de la metabolómica: Definición y principios

La metabolómica es la disciplina científica, dentro de las “ómicas”, encargada de estudiar los metabolitos, pequeñas moléculas orgánicas (<1500 Da) que intervienen en los diferentes procesos celulares y que nos revelan cómo está funcionando el metabolismo, desde una célula hasta un ser vivo. El conjunto de estos metabolitos es denominado también metaboloma (46,47). Se estima que hay más de 2.000 metabolitos diferentes que pueden ser sintetizados de forma endógena, además, de los metabolitos exógenos incorporados en la dieta, por ejemplo, las vitaminas. Otro factor contribuyente importante para el conjunto de metabolitos del organismo es la flora intestinal (48). *The Serum Metabolome* es una base de datos, disponible de forma gratuita, que contiene información detallada sobre 4651 metabolitos que se encuentran en el suero humano (47). También existe la *Human Metabolomics Database 5.0* (HMDB) en la cual podemos encontrar 220.945 metabolitos en distintos bioespecímenes como suero, orina, saliva, LCR, sudor, etc (49). La metabolómica permite estudiar los perfiles metabólicos en muestras biológicas (fluidos, tejidos, cultivos celulares, células, etc.) con la finalidad de descubrir enfermedades, factores de riesgo y determinar biomarcadores (46,50). Las cantidades de metabolitos en una enfermedad reflejan la adaptación de los sistemas biológicos a los estados patológicos (48).

El objetivo de la metabolómica es caracterizar el conjunto de moléculas pequeñas de una muestra determinada e interrogar sobre ellas a las redes metabólicas, en condiciones normales y patológicas, de manera cualitativa y cuantitativa (48).

Las tecnologías metabolómicas se están aplicando a diferentes áreas de investigación clínica, entre ellas el descubrimiento de biomarcadores y fármacos, la toxicología y la nutrición. Los primeros estudios de metabolómica se publicaron a comienzos de la primera década de este siglo (48).

Por otra parte, al igual que en otras “disciplin-ómicas” (proteómica, transcriptómica, etc.), el hecho de poder analizar varios biomarcadores en un único proceso nos permite, por una parte, acceder a la detección de un número elevado de biomoléculas simultáneamente y, además, poder conjugar la información que

ofrecen todas ellas paralelamente en un mismo entorno, ya sea fisiológico o patológico. El manejo de esa información puede facilitarnos la elaboración de algoritmos multiparamétricos que nos ayuden, principalmente, a evaluar riesgos o establecer pronósticos, tal como se viene haciendo desde hace tiempo en diversas patologías como la ECV, ERC, diversos tipos de cánceres, etc., permitiendo individualizar la actuación médica sobre cada proceso al situar a cada paciente dentro de grupos clínicos específicos (51).

Los procesos reguladores en el ADN afectan a la expresión de moléculas de procesos posteriores, como los ARN, las proteínas y los metabolitos. Los efectos de los diferentes elementos reguladores son aditivos. La biología de sistemas intenta analizar las interacciones entre las diferentes entidades moleculares para ofrecer una visión holística de los procesos biológicos y las alteraciones patológicas que se producen en la enfermedad. Las plataformas «ómicas» permiten el estudio de interacciones más complejas en sistemas biológicos. A diferencia del genoma, el proteoma y el metaboloma son dinámicos y están mucho más próximos al fenotipo de la enfermedad (figura 17) (48). El metaboloma integra la información biológica del genoma, el transcriptoma, el proteoma y las reacciones enzimáticas generales de un individuo, lo que permite la detección de los cambios fisiológicos o patológicos, a corto y largo plazo, que ocurren en las distintas patologías (52). Son tantos los datos que se pueden obtener de los perfiles metabólicos, que muchos investigadores se aventuran a afirmar que los datos de expresión génica a partir del ARNm y los análisis proteómicos no nos ofrecen un informe completo de qué está pasando en la célula, mientras que la evaluación de los perfiles metabolómicos sí nos proporciona conocimientos directos e indirectos sobre su fisiología (53).

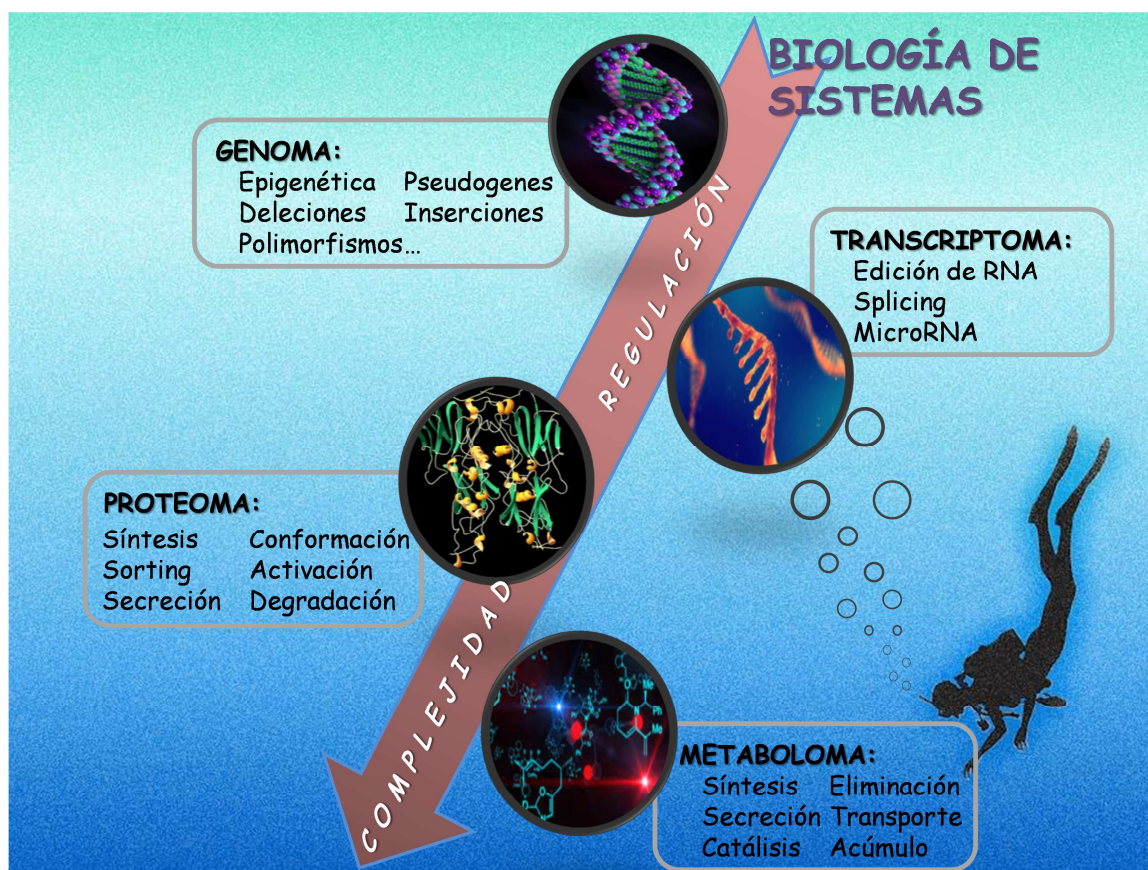


Figura 17: Visión global de la Biología de sistemas y disciplinas -ómicas. (Imagen modificada) (48).

La ventaja de las técnicas «ómicas» es que pueden usarse para comparaciones de muestras clínicas no sujetas a ninguna hipótesis, lo cual ha sido posible gracias a las mejoras alcanzadas en la sensibilidad y la exactitud de los espectrómetros de masas, al desarrollo de mejores técnicas de separación, junto con nuevos métodos de marcado y la disponibilidad de bases de datos para comparar y analizar series de datos de creciente complejidad (48).

La metabolómica, a nivel clínico y epidemiológico, proporciona una oportunidad única para poder observar las relaciones entre el genotipo y el fenotipo, así como las respuestas de un organismo en relación con los factores ambientales y el estilo de vida. Fundamentalmente, proporciona información sobre los factores que influyen en las enfermedades, permitiendo entender su patogénesis, obtener un diagnóstico temprano, una terapia adecuada y la monitorización de la misma (54).

1.3.2. Técnicas de estudio en metabolómica

Las tres técnicas que se suelen utilizar para obtener los patrones metabolómicos son:

- a. La espectroscopía basada en la resonancia magnética nuclear de protón (H-NMR). Puede detectar, en principio, cualquier sustancia orgánica por la característica de poseer protones.
- b. La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases (GC-MS). Se basa en la identificación de metabolitos que previamente han sido vaporizados y separados a través de una columna dependiendo del tiempo de vaporización (cromatografía de gases (GC)), para posteriormente ser identificados espectrométricamente según su masa, después de haber sido ionizados y acelerados tras atravesar una distancia determinada (espectrometría de masas (MS)).
- c. La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (LC-MS). Difiere de la anterior en que los metabolitos se separan de acuerdo a su solubilidad con respecto a la fase móvil líquida y en contra de la fase estacionaria, de distinta polaridad que la fase líquida, que se encuentra en el interior de la columna cromatográfica (50,55-57).

Estas técnicas son particularmente apropiadas en patologías como DM2, obesidad y desórdenes relacionados con las mismas, ya que son en su conjunto trastornos poligénicos (56).

1.3.2.1. Resonancia magnética nuclear de protón (H-NMR)

Cuando se sitúa un compuesto orgánico dentro de un campo magnético, generado por un imán, los núcleos de los protones poseen distinta energía según si su *spin* se encuentra paralelo o no al campo magnético. Esta diferencia de energía también depende del entorno químico en el que se encuentran los protones en la molécula, lo que proporciona una huella digital para esa molécula (56,58). El *spin* puede entenderse como el núcleo de un átomo que gira alrededor de su propio eje. Cuando se coloca en un campo magnético constante, los núcleos que poseen *spin* pueden excitarse, la energía del momento magnético depende de la orientación del

1. Introducción

núcleo con respecto a ese campo. La aplicación de radiación electromagnética a una frecuencia adecuada puede estimular las transiciones entre estados de alta y baja energía y esta transición proporciona la base para la H-NMR, ya que la energía absorbida puede ser detectada. Los *spines* se comportan como dipolos que se alinean a lo largo del eje de un campo magnético aplicado (figura 18) (48,58,59).

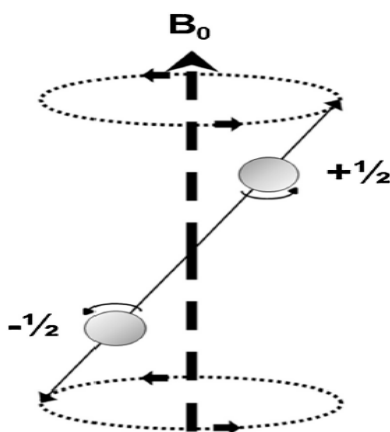


Figura 18: Precesión de protones alineados a un campo magnético (58).

Durante la relajación seguida de la excitación, las señales de radiofrecuencia que se han generado se pueden expresar como un espectro de frecuencia (figura 19) (47,58,59). El hidrógeno (protón) es el átomo más abundante en los organismos vivos y al utilizar campos magnéticos de alta potencia en muestras *in vitro* se pueden obtener espectros metabólicos de alta resolución con picos de metabolitos claramente definidos de moléculas pequeñas (58).

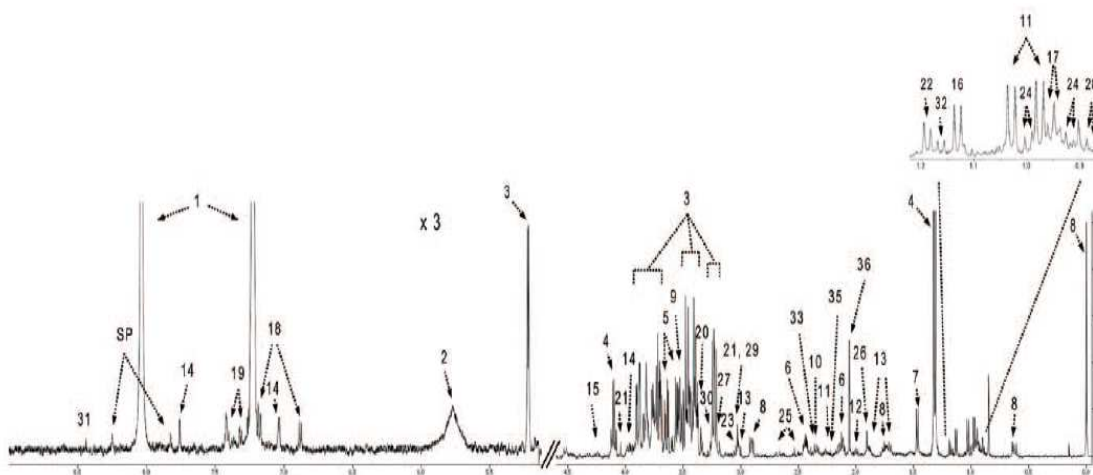


Figura 19: Espectro de H-NMR de 500 MHz típico de un suero de humano sano. Los números indican los distintos metabolitos obtenidos (47).

La resonancia magnética nuclear ocurre porque los núcleos de, al menos, uno de los isótopos de la mayoría de los elementos, poseen un momento magnético. Surge un momento magnético porque el núcleo puede girar además de poseer carga. La señal resultante, llamada *Free Induction Decay* (FID), consiste en una superposición de toda la resonancia de la muestra, que debe decodificarse para obtener la presentación familiar en forma de espectro. El proceso de decodificación se realiza mediante un proceso aritmético conocido como *Transformada de Fourier* (figura 20) (58).

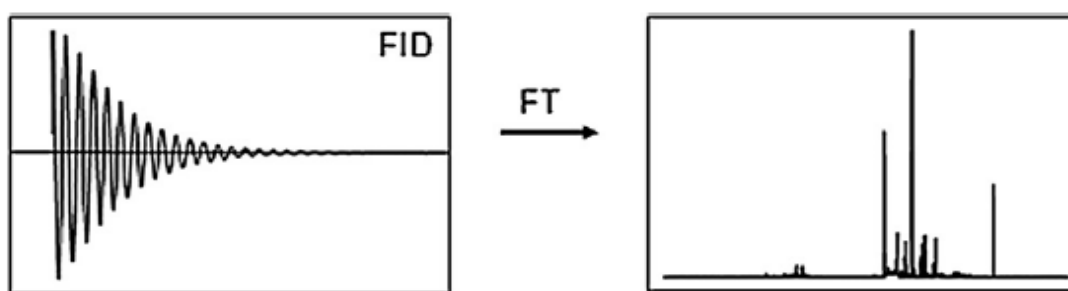


Figura 20: Transformada de Fourier (FT) a partir de *Free Induction Decay* (FID) para generar un espectro de H-NMR (58).

Los datos generados en H-NMR de múltiples muestras pueden generar alrededor de 30.000 variables (58). Para interpretar los cambios bioquímicos que ocurren en un órgano en caso de DM2, obesidad o SM, es necesario entender

1. Introducción

cómo interactúa dicho órgano con el metabolismo sistémico. A este respecto, se puede examinar el plasma/suero sanguíneo o la orina para monitorizar los cambios que ocurren a nivel orgánico. Asimismo, los extractos de tejidos se pueden examinar de forma rápida y económica mediante H-RMN, el cual es capaz de producir espectros de alta resolución a partir de tejidos intactos. Esto brinda la oportunidad de monitorizar los cambios en los metabolitos acuosos y lipofílicos en la misma muestra de forma rápida, económica y robusta (56).

Por otra parte, se debe tener en cuenta algunas consideraciones al analizar un espectro *in vitro*, ya que el metaboloma humano está influenciado por una serie de factores fenotípicos, fisiológicos y externos, que incluyen género, edad, IMC, dieta, estrés, medicamentos, consumo de tabaco, ejercicio, ayuno y consumo de alcohol 24 horas antes de la obtención de la muestra. El conocimiento de estos factores puede ayudar en el análisis de los datos, aunque muchos de estos factores a menudo están mal caracterizados (58). Algunos ejemplos de los metabolitos afectados por estos factores son: N-óxido trimetilamina, el cual se ve afectado por la dieta, pues se encuentra en mayor cantidad si se ingiere pescado que si se ingiere carne o que si la dieta es vegana; la 1-metil-histidina, la cual está aumentada en los consumidores habituales de carne; el manitol, el cual se incrementa en orina con la ingesta de manzana, piña, espárragos y zanahorias o las dietas ricas en proteínas, las cuales incrementan la excreción urinaria diaria de creatinina (58).

En definitiva, las principales ventajas de H-NMR son que se puede medir los metabolitos directamente y que permite una clara distinción entre compuestos, además de ser una técnica robusta, con reproducibilidad, rápida, que no destruye la muestra, que utiliza volúmenes de muestra pequeños y que requiere una escasa preparación de la muestra antes de ser analizada. Las muestras pueden ser biofluidos, biopsias y tejidos (58,59).

Por otra parte, una de las principales desventajas de H-NMR es el fallo en la detección de los metabolitos de escasa abundancia, particularmente los $\leq 5\text{mM}$ (nucleótidos o neurotransmisores). Además, algunos metabolitos pueden quedar “ocultos” en los espectros si están en armonía con otros metabolitos de mayor concentración. También el análisis de datos puede ser muy complejo y se requiere de personal experto en la interpretación e identificación de potenciales metabolitos importantes (58). En la figura 21 se puede ver representado de manera esquemática un sistema de H-NMR (58).

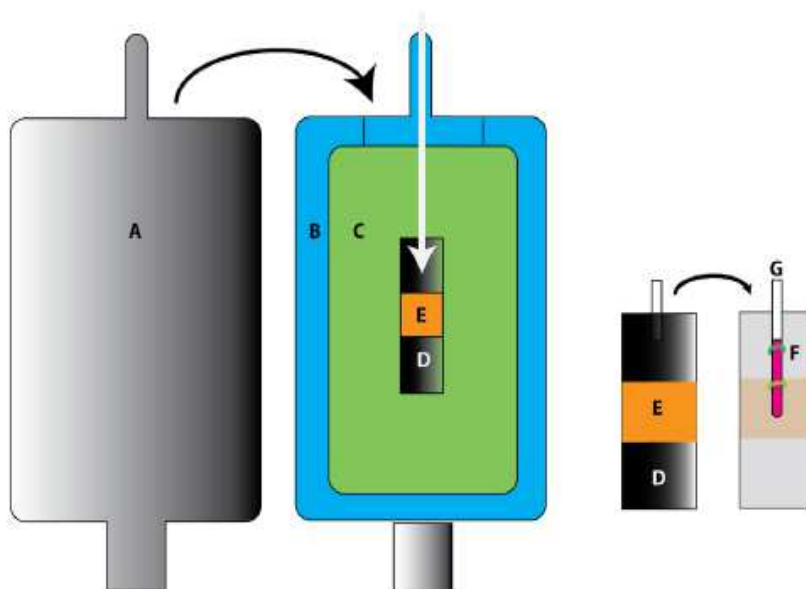


Figura 21: Diagrama esquemático de un sistema de H-NMR. A: celda exterior; B: nitrógeno líquido; C: helio líquido; D: bobina de alambre, solenoide; E: bobina de compensación; F: bobinas de pulsos de radiofrecuencia y receptor; G: muestra biofluido (58).

1.3.2.2. Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS)

La GC-MS es la piedra angular de muchos laboratorios de química analítica y también es una herramienta muy robusta para la obtención de perfiles metabólicos (56,60). En la cromatografía de gases los metabolitos volátiles se vaporizan, sin descomponerse, en la fase gaseosa y se introducen en una columna cromatográfica que contiene una fase estacionaria líquida o sólida (56,60). Algunos compuestos deben ser modificados químicamente mediante un proceso llamado derivatización

1. Introducción

antes de ser analizados para eliminar efectos de adsorción indeseados que afectarían la calidad de los datos (56,60). La solución de muestra preparada se inyecta en el cromatógrafo y los solutos se transportan a través de la columna por una fase móvil (gas inerte) y se detectan a medida que se eluyen en función de su afinidad por la fase estacionaria (59,60). La columna se encuentra dentro en un horno, donde se incrementa la temperatura a lo largo de un ciclo de tiempo y se produce el efecto de vaporización a diferentes tiempos, según el metabolito, llevándose a cabo la separación cromatográfica (56). Los solutos generalmente eluyen según se incrementa su punto de ebullición, excepto cuando hay interacciones específicas con la fase estacionaria de la columna. Se utiliza una temperatura elevada, de 50-350 °C, para garantizar que los solutos tengan una volatilidad adecuada y así puedan eluir de manera más rápida (59,60). En la figura 22 se puede observar un cromatograma obtenido a partir de un cromatógrafo de gases (GC) (47).

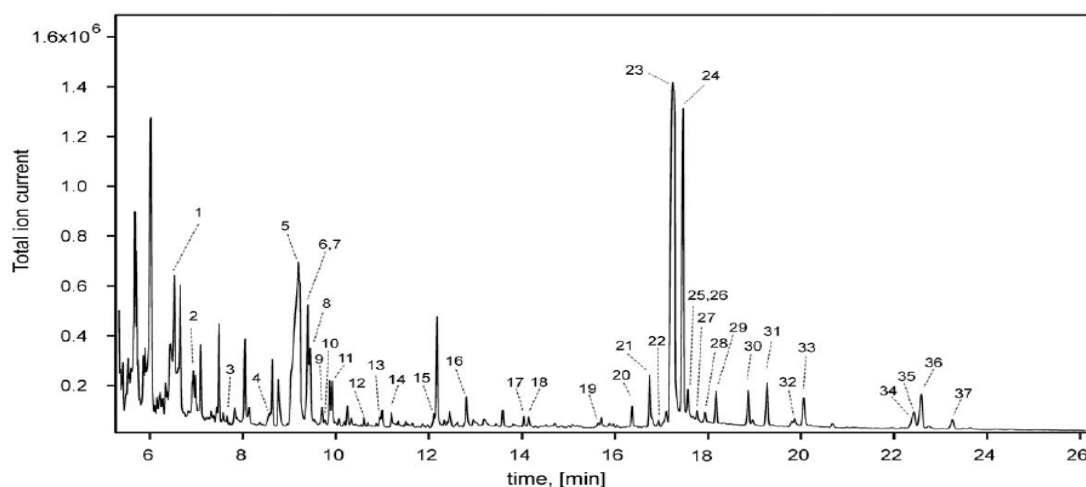


Figura 22: Cromatograma obtenido a partir de un suero de humano sano por cromatografía de gases. Los números indican los distintos metabolitos obtenidos (47).

Posteriormente, los metabolitos, según el orden de elución, son ionizados y analizados por el espectrómetro de masas (56,59).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la que los iones gaseosos que se forman a partir de moléculas o átomos de una muestra, se separan en el espacio/tiempo y se detectan de acuerdo a su relación masa-carga (m/z). Cuando los iones llegan al detector la señal que emiten es amplificada para

poder aumentar la intensidad. El detector envía la información a un ordenador donde quedan registrados los datos obtenidos, convirtiendo los impulsos eléctricos en archivos visuales. El conjunto de iones constituye el espectro de masas, que proporciona información estructural y, a menudo, una masa molecular relativa mediante la cual se puede identificar un compuesto desconocido o confirmar su estructura (60).

Para reducir las posibles variaciones entre muestras, la combinación de los distintos picos se debe realizar antes que el subsecuente análisis. El tiempo de retención depende de cómo se haya desarrollado el experimento. Los tiempos de retención de un mismo metabolito deben ajustarse entre los distintos experimentos. El proceso de alineamiento se conoce como “*alineamiento de picos*”. Este proceso incluye dos etapas: coincidencia de picos, donde se compara la identidad de picos de cada experimento, y un ajuste del tiempo de retención que se basa en los resultados de la coincidencia de picos (50,61).

Como enfoque metabólico, hay que tener en cuenta el inmenso beneficio de un método de ionización por impacto de electrones, altamente reproducible, que le permite al usuario identificar los metabolitos por sus espectros de masas haciendo uso de grandes bases de datos como *el National Institute of Standards and Technology*, tanto si el ensayo metabólico es dirigido como si no lo es (50,56). En la figura 23 se muestra el esquema de un equipo de GC-MS (59).

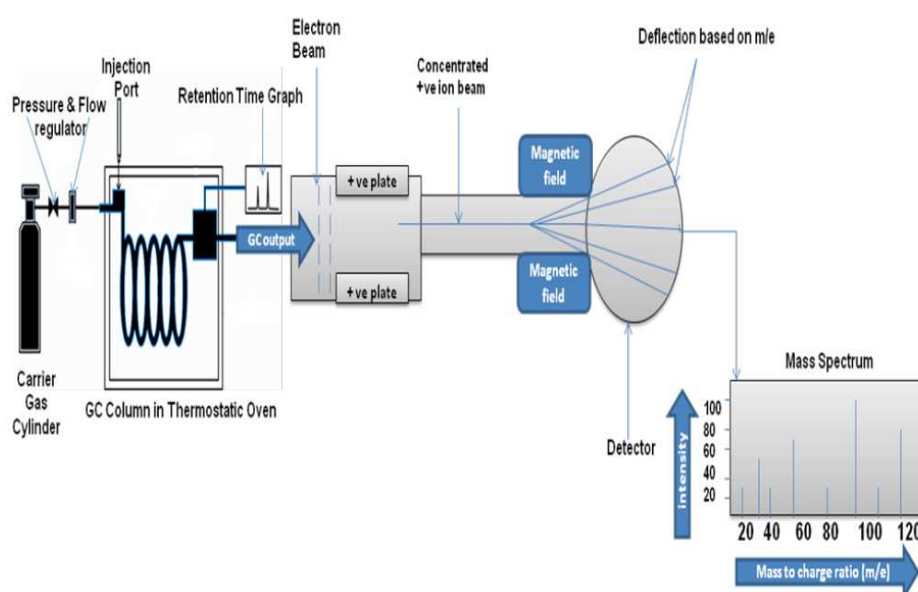


Figura 23: Esquema de un sistema GC-MS (59).

1.3.2.3. Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS)

Esta técnica es la más utilizada para examinar los distintos tipos de lípidos, de manera intacta, y así poder definir los grupos químicos que se ven alterados en distintas patologías. LC-MS también se utiliza para buscar cambios en las fracciones acuosas de tejidos, plasma sanguíneo u orina (56). La cromatografía líquida (LC) permite separar los metabolitos de la muestra de acuerdo a la solubilidad que presentan estos en la fase líquida (fase móvil) frente a su afinidad por la fase sólida que envuelve la columna (fase estacionaria). La principal ventaja frente a la GC es que la LC no requiere el proceso de derivatización. Tras obtener la separación de los metabolitos por LC y obtener un espectro similar al que se obtiene en GC, la muestra se pasa al espectrómetro de masas (56) (explicado en el apartado anterior).

Un enfoque de la metabolómica no dirigida es intentar identificar e interrogar todas las moléculas en una muestra usando primero GC o LC para su separación seguida de la detección por MS (50). Normalmente, la metabolómica utiliza métodos no dirigidos donde las condiciones analíticas están optimizadas para detectar e identificar tantas moléculas como sea posible, aunque también se utilizan métodos metabolómicos específicos en los que la cromatografía está indicada para la detección de una molécula o una clase específica de moléculas (por ejemplo, lípidos) (56). El bajo coste por muestra, al realizar LC-MS, hace que la investigación de biomarcadores metabólicos sea particularmente atractiva con esta técnica (55). En la figura 24 se muestra el esquema de equipo formado por LC-MS.

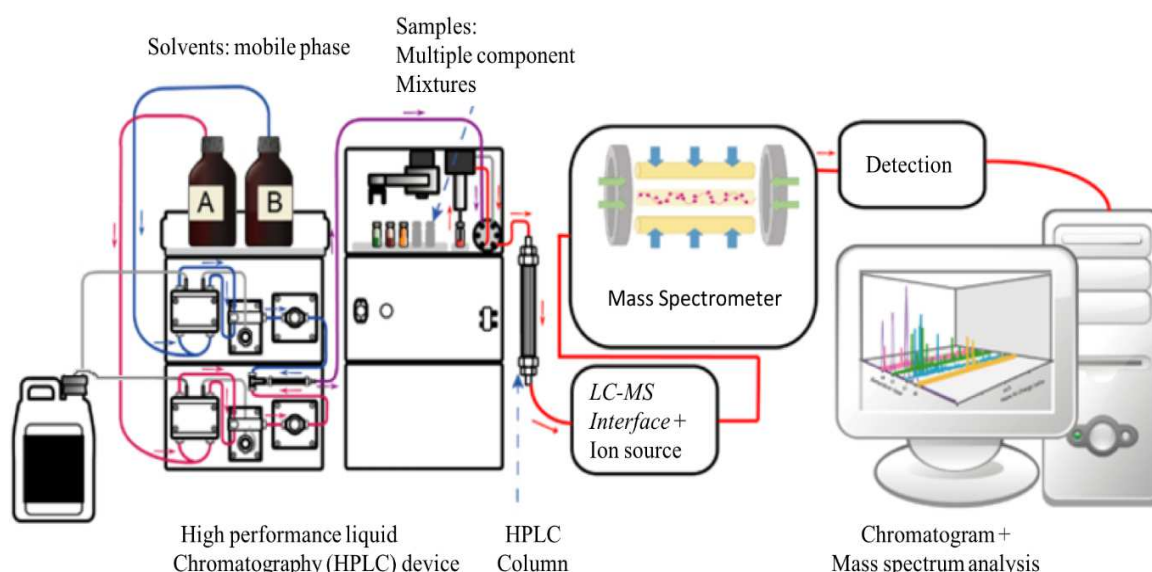


Figura 24: Esquema de un sistema LC-MS (62).

En cuanto a las principales diferencias que podemos encontrar entre las distintas técnicas, las más significativas son las encontradas entre H-NMR y MS, ya que sendos métodos son de detección. La H-NMR es menos sensible que la MS, pero aporta ventajas en la cuantificación de los metabolitos en tejidos intactos y en extractos de tejidos (48,55). La H-NMR muestra su potencia a la sensibilidad requerida principalmente en extractos ácidos. La sensibilidad y la resolución se reducen en los tejidos sólidos. La metabolómica basada en MS proporciona un método muy sensible de recopilar la información de un perfil metabólico, especialmente en los líquidos corporales. Por ejemplo, se han realizado análisis metabolómicos basados en el plasma después de una isquemia miocárdica, pruebas de esfuerzo y pacientes prediabéticos (48). Con esto se prevee que los MS serán la tecnología clave en la metabolómica para hacer avanzar nuestro conocimiento de distintas patologías multifactoriales y aportar nuevos biomarcadores candidatos (48). En la siguiente tabla se muestra las principales diferencias entre la H-NMR y MS (58).

1. Introducción

Tabla 1. Comparativa de la Resonancia Magnética Nuclear de protón (H-NMR) y la Espectroscopía de Masas (MS) (Modificación) (58)

	H-RMN	MS
SENSIBILIDAD	MENOR (nanomolar)	MAYOR (picomolar)
REPRODUCIBILIDAD	ELEVADA	MODERADA
DEGRADACIÓN DE LA MUESTRA	NO	SI
ACCESIBILIDAD A LA TECNOLOGÍA	MUY DIFÍCIL	DIFÍCIL
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	BIEN CATEGORIZADA	COMPLEJA

1.3.3. Análisis e interpretación de los resultados metabolómicos

Una vez desarrolladas las técnicas que se utilizan en los estudios de metabolómica es necesario identificar los pasos que se deben seguir para el desarrollo de un estudio metabolómico. De manera muy resumida, estos son los pasos a seguir:

1. Elección de la muestra, extracción y tratamiento previo si la técnica metabolómica de elección lo requiere.

En nuestro estudio, para la realización de la técnica experimental, se añaden 50µl tampón KH_2PO_4 ([TSP]=0,787mM en D_2O) a 450 µl de orina en un tubo de 5 mm para H-NMR.

2. Introducción en el analizador, procesamiento de la muestra y obtención de los resultados en bruto.

En nuestro estudio, la medición se realiza a 37°C. A todas las muestras se les aplica un único pulso de presaturación. Los espectros de H-NMR obtenidos se registran utilizando el espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (BrukerGmbH, Rheinstetten, Germany). Se utiliza como referencia en el espectro un doblete de hipurato a 7.83 ppm. La región de desplazamiento químico empleada para el proyecto, incluye un espectro de frecuencias con resonancias entre 0.50 y 4.20ppm.

3. Procesamiento de los resultados y comparación de los patrones de metabolitos con bases de datos oficiales.

El área del pico que corresponde a la señal de cada metabolito puede calcularse mediante la comparación con el patrón de referencia interno para obtener valores cuantitativos. Las señales que pertenecen a las regiones seleccionadas (posibles metabolitos) se cuantifican utilizando la integración y el ensamblaje de los picos mediante un programa propio semiautomático, el MATLAB 6,5 (TheMathWorks Inc., Natick, Massachusetts).

Pueden examinarse al mismo tiempo muchas clases de moléculas en las muestras extraídas, sin partir de supuestos previos respecto a los tipos de moléculas, lo que hace que la H-NMR sea un método excelente para abordar los análisis no dirigidos (48,50).

4. Estudio estadístico, que dependerá de los resultados que se quieran comparar.

En nuestro estudio se realiza un análisis univariante (prueba *post hoc*) que permite visualizar las diferencias importantes entre grupos de datos, reduciendo los datos multidimensionales a dos o tres variables. Además, las diferencias entre los grupos de pacientes se pueden caracterizar por un grupo de relaciones de metabolitos en lugar de un solo metabolito.

El análisis estadístico multivariante, en la forma de análisis de componentes principales (PCA), y el análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados (PLS-DA) son herramientas comunes que se utilizan para este propósito (58).

Además, también se pueden clasificar grupos representando los metabolitos como VIP SCORES o como BOX PLOTS.

Las técnicas metabolómicas nos permiten medir tantos metabolitos como sea posible y, a través de esto, categorizar las muestras como parte de una huella metabólica o identificar estos metabolitos como parte de un perfil metabólico y así determinar los biomarcadores como parte de una enfermedad o como parte de la respuesta / toxicidad a un tratamiento. Estas herramientas permiten un análisis de datos que proporciona correlaciones a través del metabolismo, demostrando la alta interconectividad de muchas vías metabólicas (56).

1. Introducción

El estudio de la metabolómica requiere incluir análisis de datos multivariantes, documentando de forma exhaustiva los distintos procesos de obtención, tanto de las muestras como de los resultados, para poder correlacionarlos a posteriori con otros estudios realizados en la misma área.

Esta es la principal limitación que tienen los estudios metabolómicos, más que el hecho de estar estudiando una de las “disciplin-ómicas” que se encuentra cronológicamente a la cola de sus predecesoras.

1.4. Metabolómica en la DM2

1.4.1. Marcadores metabolómicos de desarrollo de DM2

El reciente empleo de “ómicas” (metabolómica, transcriptómica, proteómica...) permite un enfoque clínicamente relevante que puede proporcionar interpretaciones muy acertadas sobre las señales biológicas relacionadas con la diabetes, ya que la posibilidad de analizar una gran cantidad de moléculas simultáneamente ha dado a las “ómicas” la capacidad de generar enormes cantidades de datos que pueden ofrecer una magnífica “ventana a la enfermedad” (26). De las ventajas que la metabolómica ofrece como metodología, derivan diversos trabajos realizados tanto de forma conjunta como individualmente (63-66).

Es conocido que la alteración en la composición y concentración de ciertos perfiles de aminoácidos y ácidos grasos está involucrada en la RI y en las fases iniciales de la DM2. La metabolómica permite acceder a la elaboración y perfeccionamiento de estos perfiles y, aunque hasta ahora su uso no ha conseguido una mejora sustancial en la evaluación del riesgo de padecer dicha alteración, sí nos permite progresar en el conocimiento del mismo y realizar nuevos enfoques que puedan llevarnos hasta nuevos y efectivos biomarcadores de riesgo (67).

En esta línea de trabajos, se han relacionado distintas rutas metabólicas que pronostican el desarrollo de la enfermedad, como son las rutas implicadas en el estrés oxidativo, regulación de lípidos o inflamación. Se ha demostrado que la disminución de antioxidantes en suero, como glutatión, vitamina C o vitamina E, entre otros, está presente en pacientes con DM2. En cuanto a los marcadores

lipídicos se ha demostrado que cuando la adiponectina, proteína reguladora del metabolismo de glucosa y lípidos y potenciadora de la acción de la insulina a nivel hepático, aumenta sus niveles en suero, se relaciona con una disminución de la incidencia de DM2. Por otra parte, la disminución de los niveles séricos de adiponectina se relaciona con aumento de obesidad. Por último, en cuanto a marcadores inflamatorios, se ha observado que niveles elevados de IL-18, en suero, están relacionados con un aumento en el riesgo de padecer DM2, independientemente del estado preinflamatorio general (54).

En un estudio metabolómico realizado por *Fiehn et al.* en el que se analizaron diferentes perfiles metabólicos en mujeres obesas de raza negra, con y sin DM2, se observó un aumento de acilcarnitinas en plasma en las diabéticas respecto de las no diabéticas, siendo estas acilcarnitinas productos de un catabolismo oxidativo incompleto de ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Por este motivo se piensa que la RI puede estar acompañada por un mayor desajuste entre la liberación de AGCL por el músculo y la capacidad oxidativa de los tejidos, lo que produce la acumulación de subproductos del catabolismo oxidativo incompleto de AGCL(68).

En el estudio realizado por *Gall et al.* se utilizó un enfoque metabolómico no dirigido para identificar los metabolitos plasmáticos asociados con el desarrollo de RI y/o intolerancia a la glucosa. Los dos metabolitos mejor clasificados fueron un ácido orgánico, el α -hidroxibutirato (α -HB) y un lípido, el 1-linoleoil-glicerofosfocolina (L-GPC) (69). El grupo de *Ferrannini et al.* propusieron los niveles de α -HB y L-GPC, en ayunas, como nuevos biomarcadores para ayudar a predecir la disglucemia y la DM2 (70).

Por otro lado, el grupo de investigación de *Suhre et al.* pusieron de manifiesto que ninguna técnica analítica individual puede cubrir todo el espectro del metaboloma humano e investigaron qué tipo de resultados se podían obtener en el campo de la investigación de la diabetes al combinar los datos metabolómicos recopilados en un conjunto de plataformas analíticas complementarias en el marco de un estudio epidemiológico (71). En el estudio participaron 40 pacientes con DM2 y 60 controles sanos donde se obtuvieron alrededor de 420 moléculas a partir de muestras de sangre en ayunas. Las observaciones clave incluyen las alteraciones

1. Introducción

de las vías metabólicas relacionadas con la disfunción renal (3-indoxisulfato), el metabolismo de los lípidos (glicerofosfolípidos, ácidos grasos libres) y la interacción con la microflora intestinal (ácidos biliares). Los biomarcadores conocidos de la diabetes se pueden identificar con este enfoque de plataforma metabolómica múltiple, incluidos los metabolitos del azúcar (1,5-anhidroglucitol), los cuerpos cetónicos (3-hidroxibutirato) y los aminoácidos de cadena ramificada (figura 25). El estudio sugiere que los marcadores metabólicos tienen el potencial de detectar complicaciones relacionadas con la diabetes que ya se encuentran en condiciones subclínicas en la población general y describe el potencial prometedor de la metabolómica en la investigación de la diabetes mediante la identificación de una serie de metabolitos afectados, tanto conocidos como novedosos, que se asocian a esta patología (71).

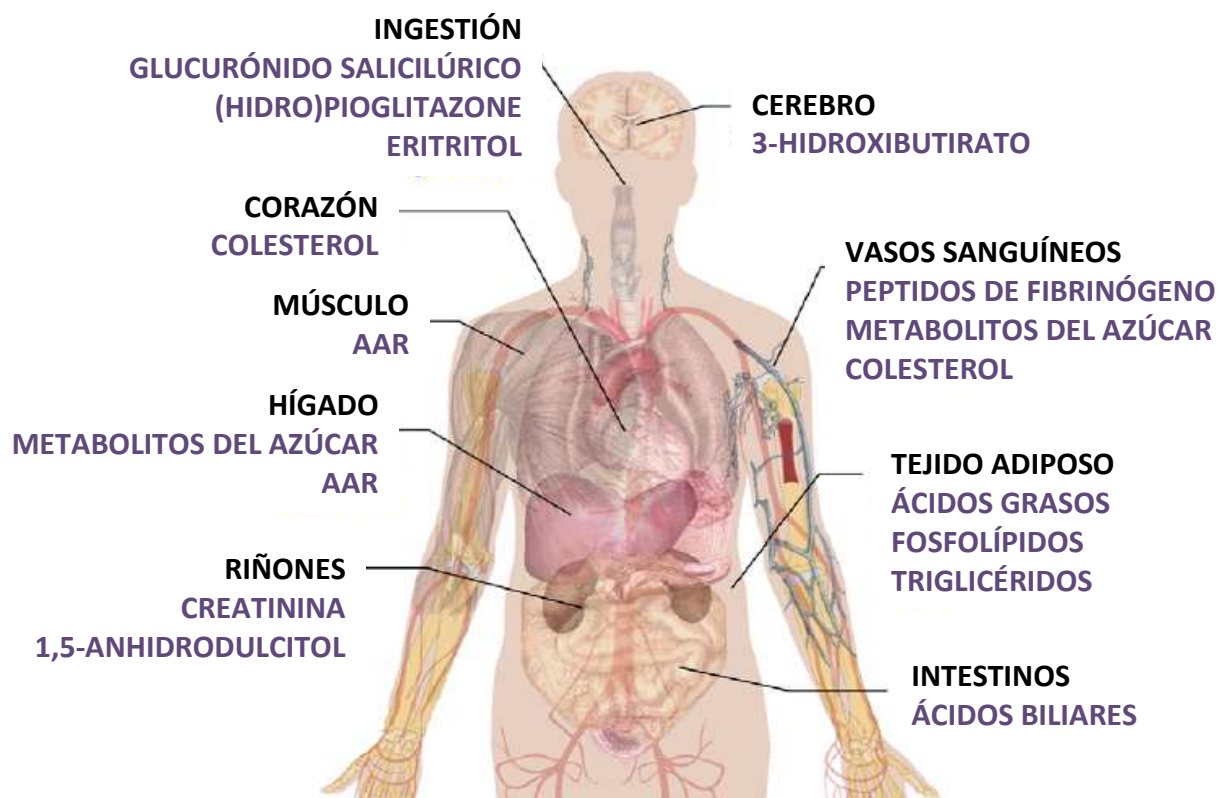


Figura 25: Principales marcadores metabolómicos y vías metabólicas implicadas en población diabética europea respecto de población no diabética. (AAR: Amino ácidos de cadena ramificada) (71).

Estos perfiles metabólicos no dirigidos representan una nueva herramienta que permite el estudio exhaustivo del metabolismo y de las redes metabólicas para obtener información sobre el fenotipo e identificar nuevos biomarcadores y vías patofisiológicas (72).

En dos estudios acerca de la predicción de desarrollar DM2 realizados por los grupos de *Wang et al.* (73) y *McKillop et al.* (54), se demuestra la relevancia que tiene el metabolismo de los aminoácidos al principio de la patogénesis de la DM2 y sugiere que ciertos perfiles de aminoácidos, como es el caso de isoleucina, leucina, valina, tirosina y fenilalanina, se relacionan con el riesgo de desarrollar la enfermedad (54,73). Hallazgo confirmado por múltiples estudios posteriores que relacionan niveles elevados de amino ácidos ramificados (AAR) y aromáticos (AAAr) con individuos que presentan RI, obesidad y DM2, además de estar relacionados con la predicción de la progresión de la DM2 (72). Son múltiples los estudios que relacionan los niveles elevados de AAR y AAAR con individuos que presentan resistencia a la insulina, obesidad y DM2, además de estar relacionados con la predicción de la progresión de la DM2 (54,72-75). Los AAR, particularmente la leucina, juegan un papel esencial en la secreción y acción hormonal, así como en la señalización intracelular. La leucina está involucrada en la captación aislada de glucosa en músculo, en la síntesis de glucógeno a través de la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) y en el efecto de secreción de insulina en el páncreas (75).

Borros et al. (76) y *Guash-Ferré et al.* (77) realizaron sendas revisiones sistemáticas para identificar los posibles metabolitos que permitan relacionar DM1 y/o DM2, así como prediabetes y la DM2 respectivamente. En sendos estudios se describen distintos compuestos bioquímicos agrupados dentro de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, lípidos, hidratos de carbono y cuerpos cetónicos, los cuales ofrecen una visión de cómo se comportan los distintos metabolitos dentro de la patología diabética (76,77). En la tabla 2 se agrupan los distintos metabolitos, a los que hacen referencia las revisiones y los estudios mencionados a lo largo de las distintas etapas del continuo disglucémico actual.

1. Introducción

Tabla 2. Metabolitos relacionados con DM2, prediabetes y DM1.

METABOLITOS	PREDIABETES	DM2	DM1
AMINOÁCIDOS	↑Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) ⁽⁵⁴⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁷⁾	↑Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) ⁽⁵⁴⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁷⁾	↑Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) ⁽⁷⁶⁾
	↑Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) ⁽⁵⁴⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁷⁾	↑Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) ⁽⁵⁴⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾	↑Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) ⁽⁷⁶⁾
		↑Ratio glutamato/ glutamina ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾	
		↓Glicina ⁽⁷⁷⁾	
	↑Arginina, citrulina y ornitina ⁽⁷⁷⁾	↑Arginina, citrulina y ornitina ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾	
ÁCIDOS GRASOS	↑Ac. palmítico, ac. esteárico y ac. mirístico ⁽⁷⁷⁾	↑Ac. dodecanoico ⁽⁷⁶⁾ , ac. palmítico, ac. Esteárico, ac. mirístico ⁽⁷⁷⁾	↑Ac. palmítico, ac. esteárico y ac. mirístico ⁽⁷⁶⁾
LÍPIDOS	↑1-linoleoil-glicerofosfolina ⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾	↑Esfingomielina y glicerofosfolípidos ⁽⁷⁶⁾	↓Esfingomielina y glicerofosfolípidos ⁽⁷⁶⁾
		↓Esfingomielina y glicerofosfolípidos ⁽⁷⁷⁾	
		↑Fosfatidilcolina ⁽⁷⁷⁾ ↑1-linoleoil-glicerofosfolina ⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾ ↓Alquilfosfatidilcolina ⁽⁷⁷⁾	
CUERPOS CETÓNICOS	↑β-OH-butirato, 3-OH-butirato ⁽⁷⁶⁾ y α-OH-butirato ⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾	↑β-OH-butirato, 3-OH-butirato ⁽⁷⁴⁾ y α-OH-butirato ⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾	
ALCOHOLES		↓1,5 anhidroglucitol ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁴⁾	
HIDRATOS DE CARBONO	↑Glucosa, dihexosa, manosa, arabinosa y fructosa ⁽⁷⁷⁾	↑Glucosa, dihexosa, manosa, arabinosa y fructosa ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾	
ÁCIDOS ORGÁNICOS y ACILCARNITINAS	↑Acilcarnitinas (C2) ⁽⁷⁷⁾	↑↑Acilcarnitinas (C2,C3,C6,C8 y C10) ⁽⁷⁷⁾	
	↑Ac. Acético, dimetil ester y ac. maleico ⁽⁷⁷⁾	↑Ac. Acético, dimetil ester y ac. maleico ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾	
		↓Propionilcarnitina ⁽⁷⁷⁾	

En la figura 26 se pueden observar las relaciones de los metabolitos plasmáticos citados en los estudios y revisiones anteriores con respecto al desarrollo, la progresión y el riesgo de desarrollar prediabetes y DM2. Se pueden englobar a los metabolitos α -hidroxibutirato, β -hidroxibutirato y L-GPC como posibles predictores de prediabetes, apareciendo antes de que se dé la RI y TAG (69,70). El estado disglucémico de prediabetes ya presenta niveles elevados de AAR y AAAR (54,73) y de la relación glutamato/glutamina (Glu/Gln) (76,77). Previa a la instauración del estado disglucémico de DM2, también aumentan los niveles de AAR, AAAR y β -hidroxibutirato y la relación Glu/Gln (54,73,76,77), donde además se ha observado una relación entre el aumento de AAR, AAAR y la RI (72). Una vez instaurada la DM2, se produce un mayor aumento de los metabolitos descritos.

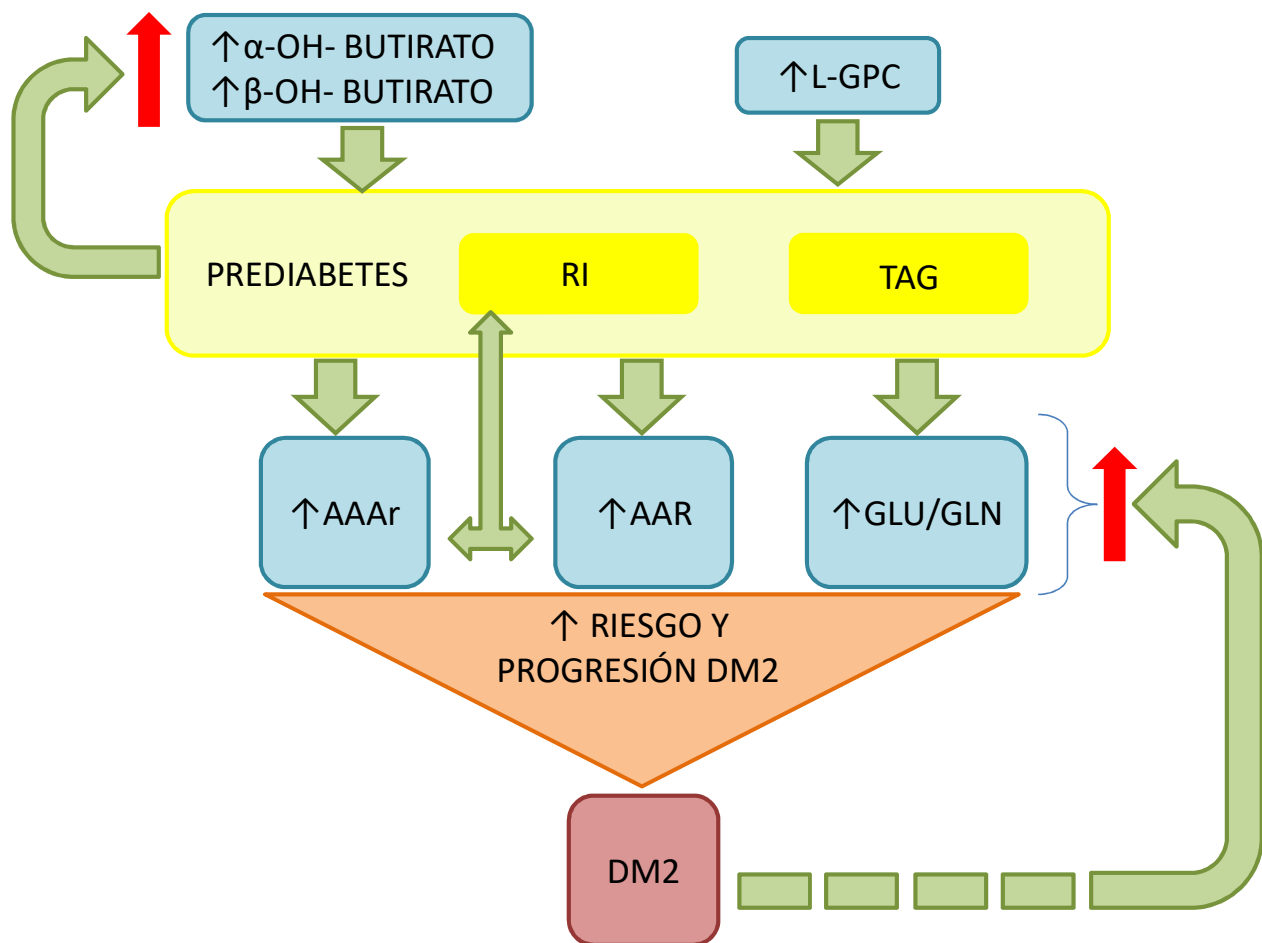


Figura 26: Metabolitos implicados en el desarrollo, la progresión y el riesgo de la DM2.

1.4.2. Marcadores metabolómicos de desarrollo de complicaciones diabéticas

En patologías como la DM2, la enfermedad renal crónica (ERC) o la enfermedad cardiovascular (ECV), con un complejo conjunto de interacciones entre factores ambientales y genética, y en las que se observan múltiples cambios en los perfiles bioquímicos del organismo, esta metodología nos da la posibilidad de encontrar potenciales marcadores para el diagnóstico y la elección de sus terapias (54,78).

1.4.2.1. Complicaciones macrovasculares

Según la *American Diabetes Association* (ADA), la DM2 se define como una ECV de origen metabólico, debido a que las estadísticas indican que en occidente más del 80% de los pacientes con DM la mortalidad y la morbilidad es de tipo CV, mientras que menos del 1% de los pacientes diabéticos muere por trastornos derivados del descontrol metabólico (79).

En un estudio transversal y descriptivo realizado por el grupo de *Ramos et al.* con 1005 pacientes con DM2, se observó que el 10,7% del total de los casos afectados (108 pacientes) presentaron cardiopatía isquémica, además se asoció significativamente la DM2 con el desarrollo de cardiopatía isquémica y con distintas patologías como HTA, edad ≥ 55 años en mujeres y edad ≥ 45 años en hombres, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y SM (80).

Una de las principales carencias de evidencia en el manejo de la DM consiste en la estratificación del riesgo CV. Las herramientas de cálculo de riesgo disponibles para población diabética siguen siendo deficientes en su capacidad predictora, que podría mejorar con la incorporación de biomarcadores metabolómicos. Por lo tanto, el hallazgo de nuevos biomarcadores es un desafío importante en esta área (26).

Liu et al. compararon muestras de plasma de 15 controles sanos, 13 pacientes con enfermedad coronaria (EC), 15 pacientes con DM2 sin EC y 28 pacientes con DM2 con EC. Se identificaron entre 11 y 12 metabolitos representativos de EC y DM2 respectivamente, mediante el análisis de perfiles plasmáticos metabolómicos basados en H-NMR, que incluían principalmente alanina, arginina, prolina, glutamina, creatinina y acetato. A partir de estos

resultados los autores construyeron un modelo para detectar DM2-EC con una sensibilidad del 92,9%, una especificidad del 93,3% y una precisión del 93,2%, validando la solidez del perfil metabolómico plasmático hallado como predictor de EC en población diabética. En la figura 27 podemos observar las distintas rutas metabólicas implicadas en el estudio de *Liu et al.* con los distintos metabolitos afectados (66).

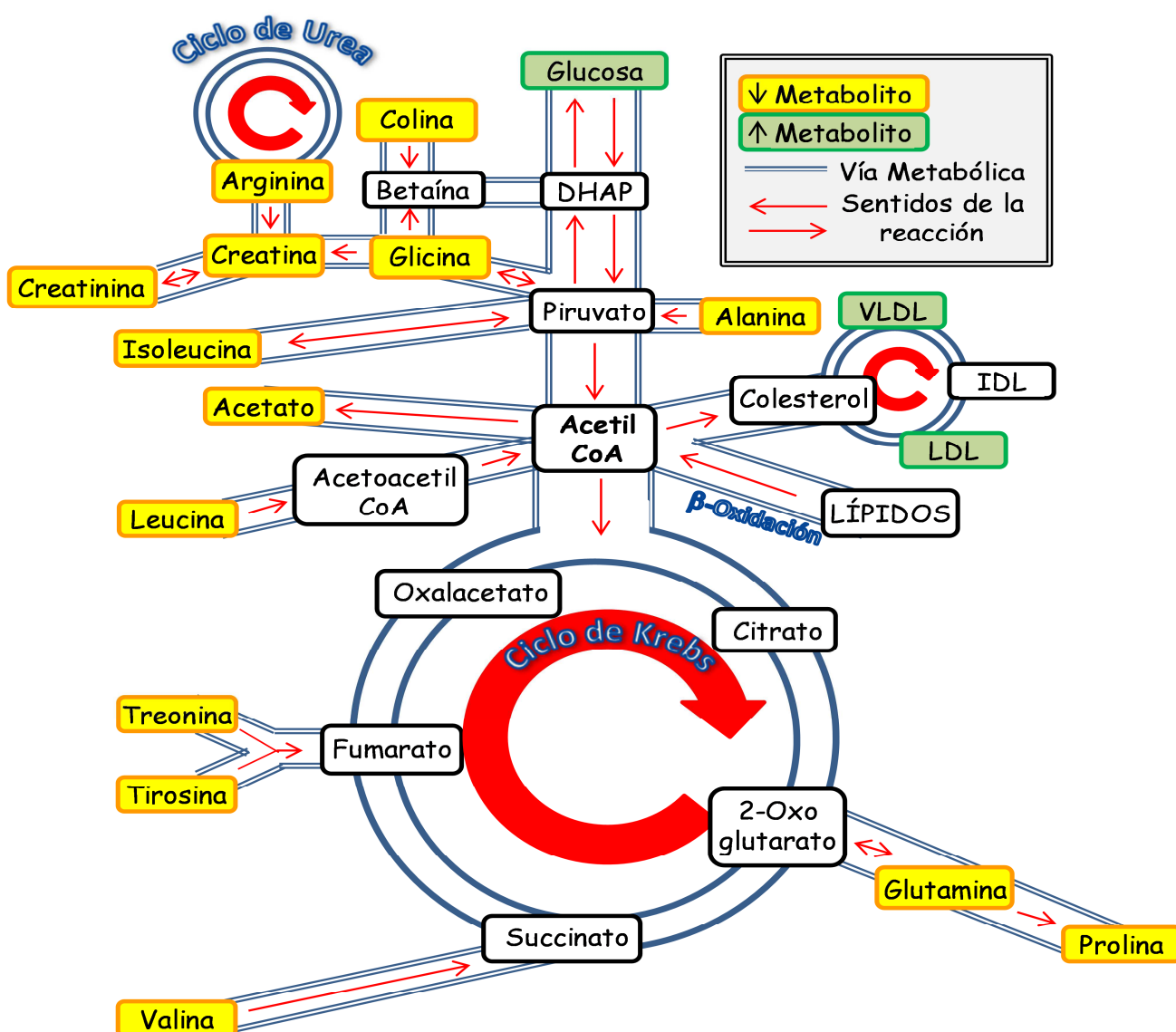


Figura 27: Diagrama de las rutas metabólicas que se han visto alteradas y que han sido detectadas por el análisis de H-NMR en población diabética que han desarrollado EC. Se muestra la relación existente entre los metabolitos de las rutas metabólicas identificadas. (DHAP: Dihidroxiacetona fosfato; IDL: Lipoproteína de

densidad intermedia; LDL: Lipoproteína de baja densidad; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad). (Modificación) (81).

1.4.2.2. Complicaciones microvasculares

La afectación microvascular más características de la DM es la insuficiencia renal (IR), la cual se detecta inicialmente mediante la tasa de excreción de albúmina en orina. La IR es uno de los síntomas de daño crónico microvascular en la DM, además de producir un incremento en la tasa de mortalidad (13,68). Es una de las peores complicaciones que afecta aproximadamente a un tercio de los pacientes con DM. No existe tratamiento una vez diagnosticada, pero si se actúa en estadios subclínicos se puede prevenir o, al menos, ralentizar la progresión (82).

El grupo de investigación de *Van der Kloet et al.* hipotetiza que ligeros cambios en el metaboloma urinario de pacientes con DM precede al aumento clínicamente significativo de la tasa de excreción de albúmina en orina. El estudio evalúa la progresión de pacientes con patología renal de causa diabética observando que los pacientes que evolucionan de normoalbuminuria a microalbuminuria respecto de aquellos que se mantienen normoalbuminúricos presentan elevaciones de acilcarnitinas, valina, cistina y ácido hidroxiglutarico; y descensos de ácido hipúrico, ácido glicólico, D-ácido glutámico y ácido 3-hidroxifenilacético, permitiendo la distinción entre ambos grupos con una exactitud de un 75% y una precisión de un 73% (82).

En otro estudio el grupo de *Rhee et al.* realizaron perfiles metabolómicos en plasma de 200 pacientes (estudio anidado de casos y controles) para evaluar la progresión de ERC. Los resultados centraron el interés en los aminoácidos arginina, metionina y treonina como potenciales indicadores de la función metabólica renal y como marcadores de pronóstico renal, encontrándose disminuidos en el grupo de casos con respecto al grupo de control (83).

Esto pone de manifiesto que otras patologías derivadas de las complicaciones de la DM2, como es la ERC, también pueden beneficiarse en múltiples aspectos de las plataformas metodológicas descritas (82,84) y así obtener diferentes enfoques terapéuticos y/o farmacológicos (46,85).

En la tabla 3 se agrupan los distintos metabolitos, a los que hacen referencia las revisiones y los estudios mencionados en las complicaciones macrovasculares y microvasculares.

Tabla 3. Metabolitos relacionados con el desarrollo de complicaciones diabéticas macrovasculares y microvasculares (P: Plasma; O: Orina).

GRUPO METABÓLICO	COMPLICACIÓN MACROVASCULAR	COMPLICACIÓN MICROVASCULAR
AMINOÁCIDOS	↓ Alanina, Arginina, Prolina y Glutamina (P) (66)	↓ Arginina, Metionina, Treonina (P) (83) y Ac. D-glutámico (O) (82) ↑ Valina y Cistina (O) (82)
ÁCIDOS ORGÁNICOS		↓ Ac. hipúrico (O) (82) ↑ Acilcarnitina y Ac. D-OH-glutámico (O) (82)
ORGANONITROGENADOS	↓ Creatinina (P) (66)	
CUERPOS CETÓNICOS	↓ Acetato (P) (66)	↓ β-OH-fenilacético y Ac. glicósico (O) (82)

1.4.3. Marcadores metabolómicos de respuesta a fármacos antidiabéticos

Existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta glucémica a los distintos antidiabéticos (64). Se piensa que la respuesta variable al tratamiento para la DM2 es debida, parcialmente, al resultado de variaciones genéticas que afectan el metabolismo del medicamento. En algunos casos las variaciones genéticas pueden resultar en una mayor eficacia al tratamiento, como los pacientes que tienen variantes en el gen que codifica el citocromo P450-2C9 y que tienen un

1. Introducción

aclaramiento de sulfonilureas disminuido, o como los portadores de ciertas variantes del receptor PPAR- γ , que muestran mayores disminuciones en los niveles de glucosa en sangre y HbA1c en respuesta a la toma de rosiglitazona y pioglitazona que los no portadores (21).

Van Doorn et al. analizaron los patrones metabólicos diferenciales entre diabéticos y no diabéticos en relación a la respuesta a la toma del inhibidor del receptor PPAR- γ rosiglitazona. Se obtuvieron muestras de orina y plasma de los participantes. Respecto de los no diabéticos, el tratamiento con rosiglitazona en el grupo con DM2 condujo a una rápida reducción relativa de los hipuratos urinarios y los aminoácidos aromáticos, a un aumento de los aminoácidos de cadena ramificada en plasma, así como alanina, glutamina y glutamato. Los análisis basales exploratorios mostraron que los metabolitos de la orina y del plasma discriminaban entre los géneros y el estado de la enfermedad (86).

El grupo de *den Ouden et al.* analizaron la respuesta al tratamiento con metformina y/o sulfonilurea de diabéticos a los cinco años del diagnóstico de su DM2 observando que la disminución de HbA1c se asociaba a un aumento significativo de metabolitos en el grupo en tratamiento con metformina y en el grupo de terapia combinada (metformina + sulfonilurea). Algunos de estos metabolitos están implicados en el metabolismo hepático, como el ácido 2-OH-butanoico (implicado en la resistencia a la insulina), el ácido 3-OH-butanoico (implicados sendos también en estrés oxidativo), 2-OH-piperidina y 4-oxoprolina, los cuales se vieron más aumentados cuanto mayor fue la disminución de la HbA1c en el grupo de terapia combinada (64).

Siguiendo esta misma línea *Dong et al.* analizaron los cambios metabólicos en orina que acontecían en ratas "*Zucker diabetic fatty (ZDF)*" (ratas que desarrollan hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia) en respuesta al tratamiento con metformina y/o glimepirida. El análisis metabólico de las ratas ZDF reveló respecto de las ratas control no diabéticas elevaciones en los niveles de glioxilato, dicarboxilato, pentosas fosfato, interconversiones del glucuronato y los esfingolípidos, viéndose implicados 29 metabolitos endógenos. Tras el tratamiento con estos antidiabéticos orales, observaron que seis metabolitos disminuían significativamente, alcanzando niveles de normalidad y que

dos de ellos (ácido cítrico y esfinganina) podían utilizarse como indicadores de respuesta glucémica (87). El ácido cítrico juega un importante papel en el ciclo de Krebs y en el metabolismo glucídico, mientras que la esfinganina bloquea el transporte de colesterol post-lisosomal e inhibe la esterificación del colesterol inducida por las LDL. Estos resultados demuestran que el tratamiento con metformina y/o glimepirida podrían revertir y posiblemente regular las rutas metabólicas del metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato, el metabolismo de los esfingolípidos y el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (figura 28) (87).

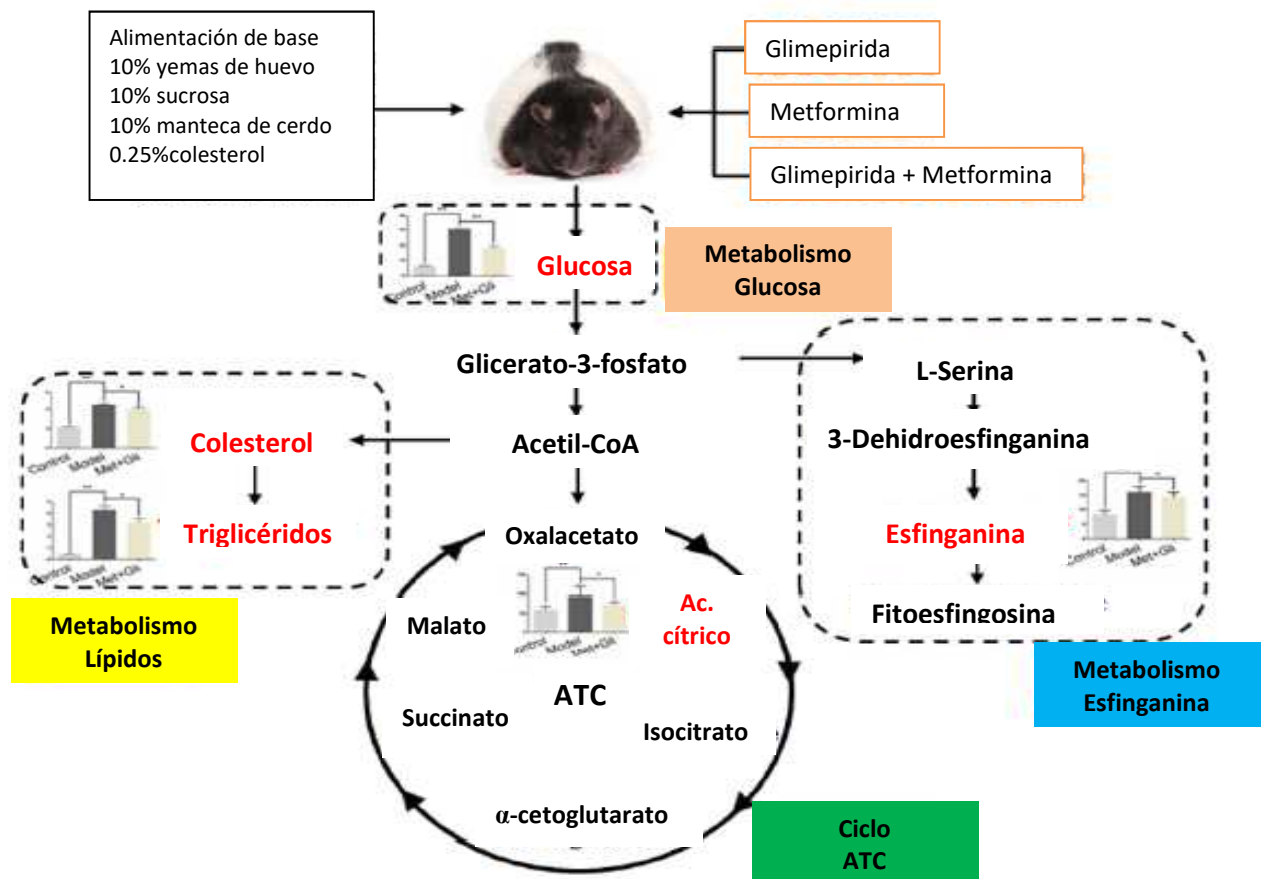


Figura 28: Visión sistemática de las rutas metabólicas asociadas al tratamiento de metformina y/o glimepirida en ratas *Zucker diabetic fatty* (ZDF). Los metabolitos en rojo representan los metabolitos alterados con respecto al grupo control. En naranja, amarillo, verde y azul se indican las vías metabólicas implicadas (ATC: Ácidos tricarboxílicos) (87).

1. Introducción

Estos estudios confirman la idea de que la metabolómica puede ser utilizada como herramienta para identificar potenciales biomarcadores predictores de la respuesta a tratamientos antidiabéticos (64,87).

También existen trabajos que relacionan la metabolómica con la terapia utilizada en patología CV, evaluando el efecto metabólico que producen algunos fármacos antihipertensivos (beta-bloqueantes y diuréticos) e hipolipemiantes, lo cual nos permite comprender de manera más exhaustiva cómo actúan dichos tratamientos en nuestro metabolismo y deducir que implicaciones conllevan (88).

Trupp et al. observaron, en relación con la toma de simvastatina, un aumento de los niveles de metabolitos como cistina, ornitina, citrulina y lisina, los cuales se relacionan con una disminución de los niveles de LDL en el grupo de respondedores totales al tratamiento. Los metabolitos que mejor separaban los grupos de respuesta pretratamiento y podían predecir la respuesta de LDL fueron xantina, ácido 2-hidroxisuccínico, ácido succínico y ácido esteárico. Dichos metabolitos se encontraban disminuidos en el grupo con mejor respuesta al tratamiento. En conjunto, los hallazgos de este estudio indican que los grupos de metabolitos involucrados en múltiples vías que no están directamente relacionadas con el metabolismo del colesterol pueden desempeñar un papel en la modulación de la respuesta al tratamiento con simvastatina a la vez que podrían utilizarse como predictores de respuesta a la toma de este hipolipemiante (85).

En otro estudio, *Pena et al.*, descubrieron una serie de metabolitos séricos capaces de mejorar la predicción de la respuesta de la excreción urinaria de albumina en pacientes con DM con micro y macroalbuminuria, en respuesta a un bloqueador del receptor de angiotensina (ARB). Identificaron como predictores de respuesta los metabolitos dimetilarginina asimétrica (ADMA), asparagina, glutamina, citrulina, fosfatidilcolinas (C36:0 y C42:2), lysofosfatidilcolinas (C16:0 y C16:1) y triptófano. Los metabolitos incluidos en el estudio se relacionan con los mecanismos moleculares generales de estrés oxidativo, de inflamación y de las vías implicadas en la fibrosis. Especialmente la actividad del óxido nítrico sintasa 3 (NOS3) parece ser un factor relevante en la predicción de la disminución de la albuminuria en respuesta a ARB (52).

Tabla 4. Marcadores metabólicos de respuesta a fármacos antidiabéticos.

GRUPO FARMACOLÓGICO	FÁRMACO	GRUPOS COMPARADOS	MEDIDOR EFICACIA	MARCADORES METABOLÓMICOS DE RESPUESTA FAVORABLE										
ANTIDIABÉTICOS	Metformina ± Sulfonilurea (64)	Diabéticos	↓HbA1c	↑Ac. 2-OH-butanoico (P) ↑Ac. 3-OH-butanoico (P) ↑2-OH-piperidina (P) ↑4-oxoprolina (P)										
	Metformina ± Glimepirida (87)	Ratas ZDF		↑Glioxilato (O) ↑Dicarboxilato (O) ↑Pentosas fosfato (O) ↑Esfingolípidos (O) ↓Ac. cítrico (O) ↓Esfinganina (O)										
	Rosglitazona (86)	Diabéticos vs no Diabéticos		↑Aminoácidos ramificados (P) ↑Alanina (P) ↑Glutamina (P) ↑Glutamato (P) ↓Aminoácidos aromáticos (O) ↓Hipurato (O)										
HIPOLIPEMIANTES	Simvastatina (85)	LDLc elevada	LDLc	<table> <tr> <td><u>Postto</u> (P)</td> <td><u>Pretto</u> (P)</td> </tr> <tr> <td>↑Cistina</td> <td>↓Xantina</td> </tr> <tr> <td>↑Ornitina</td> <td>↓Ac. 2-OH-valérico</td> </tr> <tr> <td>↑Citrulina</td> <td>↓Ac. succínico</td> </tr> <tr> <td>↑Lisina</td> <td>↓Ac. esteárico</td> </tr> </table>	<u>Postto</u> (P)	<u>Pretto</u> (P)	↑Cistina	↓Xantina	↑Ornitina	↓Ac. 2-OH-valérico	↑Citrulina	↓Ac. succínico	↑Lisina	↓Ac. esteárico
<u>Postto</u> (P)	<u>Pretto</u> (P)													
↑Cistina	↓Xantina													
↑Ornitina	↓Ac. 2-OH-valérico													
↑Citrulina	↓Ac. succínico													
↑Lisina	↓Ac. esteárico													
ANTIHIPERTENSIVOS	ARAI (52)	Diabéticos con microalbuminúria	Excreción urinaria de albúmina	Dimetilarginina asimétrica (ADMA) (S) Asparagina (S) Glutamina (S) Citrulina (S) Fosfatidilcolinas (C36:0 y C42:2) (S) Lysofosfatidilcolinas (C16:0 y C16:1) (S) Triptófano (S)										

(P:Plasma; O: Orina; S: Suero)

2. PERTINENCIA Y TRASCENDENCIA DEL PROYECTO ACTUAL

Ya hemos comentado la trascendencia que en nuestra sociedad tiene la DM2, tanto por su elevada prevalencia como por su repercusión e impacto, al ser el motor del desarrollo de complicaciones crónicas tanto micro como macrovasculares. Recordemos cómo la principal causa de ceguera sigue siendo la DM, además de ser también la primera causa que lleva a un paciente a un programa de diálisis. Si añadimos las complicaciones derivadas de las frecuentes amputaciones y que la enfermedad aterosclerosa sigue siendo la principal causa de mortalidad en nuestro medio, es fácil entender el impacto funcional y de consumo de recursos que supone. Si bien es cierto que la incidencia de este capítulo está descendiendo en las últimas décadas, probablemente como consecuencia de un abordaje temprano del conjunto de todos los factores de riesgo vascular a los que se asocia la DM, a pesar de ello la incidencia de las enfermedades cardiovasculares en diabéticos prácticamente dobla a la registrada en la población no diabética (89).

Teniendo en cuenta las previsiones de incremento significativo del número de diabéticos en nuestro país y a nivel mundial es fácil entender la trascendencia de todo esfuerzo destinado a un mejor entendimiento de la diabetes y de su abordaje(4).

Dentro de las estrategias de mejora en la evolución de la diabetes sin duda es crucial un tratamiento temprano, lo cual pasa por una detección en la fase donde no se ha desarrollado plenamente. La diabetes se caracteriza por una enorme variabilidad fenotípica a lo largo de un continuo disglucémico que en la mayor parte del tiempo de evolución es asintomático; pero el hecho de que se trate de un proceso evolutivo en el tiempo posibilita una intervención temprana, sin embargo, ello se ve entorpecido por la ausencia de manifestaciones clínicas en las fases iniciales de resistencia insulínica y prediabetes. La heterogeneidad, así como pobre expresión clínica en las fases de prediabetes, podría soslayarse en el caso de obtener un mejor fenotipado de estas fases.

Las disciplinas -ómicas, y entre ellas la metabolómica, muy probablemente nos sirvan para desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico temprano e incluso para diseñar nuevas moléculas con fines farmacológicos, al desentrañar nuevos

2. Pertinencia y trascendencia del proyecto actual

mecanismos patofisiológicos que intervienen evolutivamente a lo largo del continuo disglucémico. También es posible que en un futuro próximo podamos utilizar esta metodología para mejorar la predicibilidad del desarrollo de complicaciones crónicas e intervenir de forma más eficiente y temprana, si no evitándolas, al menos sí retrasándolas a través de un abordaje terapéutico ajustado de forma individualizada.

Respecto de otras ciencias -ómicas (como la genómica o la proteómica) una de las principales ventajas de la metabolómica es el hecho de su mayor “cercanía” al fenotipo final del proceso estudiado. Cabe resaltar, también la facilidad de obtención del material biológico necesario, que en el caso del actual estudio es una simple muestra de orina.

3. HIPOTESIS DE TRABAJO

3. Hipótesis de trabajo

- Hipótesis 1

H0: No hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con diabetes mellitus 2 respecto de pacientes no diabéticos.

H1: Sí hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con diabetes mellitus 2 respecto de pacientes no diabéticos.

- Hipótesis 2

H0: No hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con prediabetes respecto de pacientes no diabéticos.

H1: Sí hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con prediabetes respecto de pacientes no diabéticos.

- Hipótesis 3

H0: No hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con prediabetes respecto de pacientes diabéticos.

H1: Sí hay diferencias en el perfil metabólico de individuos con prediabetes respecto de pacientes diabéticos.

- Hipótesis 4

H0: No hay un perfil metabólico evolutivo a lo largo del continuo disglucémico.

H1: Sí hay un perfil metabólico evolutivo a lo largo del continuo disglucémico.

3. Hipótesis de trabajo

4. OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal

- Caracterización metabolómica de individuos con DM2.

4.2. Objetivos secundarios

- Caracterización metabolómica de individuos con prediabetes.
- Caracterización metabolómica del continuo disglucémico.
- Identificación de las principales vías metabólicas implicadas en la DM2.
- Identificación de las principales vías metabólicas implicadas en la prediabetes.
- Identificación de las principales vías metabólicas implicadas en el continuo disglucémico.

4. Objetivos

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo transversal de no intervención

5.2. Población de estudio

El reclutamiento ha sido realizado entre los pacientes atendidos en la consulta de Medicina Interna y aquellos detectados por el Servicio de Análisis Clínicos del Departamento de Salud de Alcoy, en el interior de la provincia de Alicante. Las valoraciones clínicas como estudios antropométricos y en su caso ajustes terapéuticos han sido realizados en la consulta externa de Medicina Interna y siempre según práctica clínica habitual.

Se han distinguido tres grupos categóricos a lo largo del continuo disglucémico: pacientes normoglucémicos (nG), pacientes prediabéticos (pDm) y pacientes diabéticos (DM). Compusieron el grupo Dm aquellos con DM2 ya conocida y seguida al menos en el año previo en su centro de salud. Los grupos pDm y nG se obtuvieron de entre los pacientes sometidos por causas diferentes a una sobrecarga oral con 75 g de glucosa en los dos meses previos a la inclusión. Estos pacientes se identificaron a partir de los registros del Servicio de Análisis Clínicos del Departamento de Alcoy y voluntarios sanos sin diabetes conocida. Se clasificaron como pDm o nG según criterios de la *American Diabetes Association* (90) y aparecen expresados en la tabla 5.

Tabla 5. Criterios diagnósticos categóricos de DM y prediabetes tras TTOG 75 según criterios ADA (*American Diabetes Association*) (90).

	PREDIABETES (TAG)	DIABETES
2h post 75gr glucosa oral	Valores entre 140 mg/dL (7.8 mmol/L) y 199 mg/dL (11.0 mmol/L)	Valores ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa

5.2.1. Criterios de inclusión

- Mayores de 18 años.
- Diabéticos con al menos un año de seguimiento en Atención Primaria o pacientes con test de sobrecarga oral con 75 g de glucosa.
- Firma del Consentimiento Informado.

5.2.2. Criterios de exclusión

- Menores de 18 años.
- Diabéticos con menos de un año de seguimiento previo en Atención Primaria.
- Negativa a la firma del Consentimiento Informado.
- Deseo expreso del paciente de retirada del estudio.

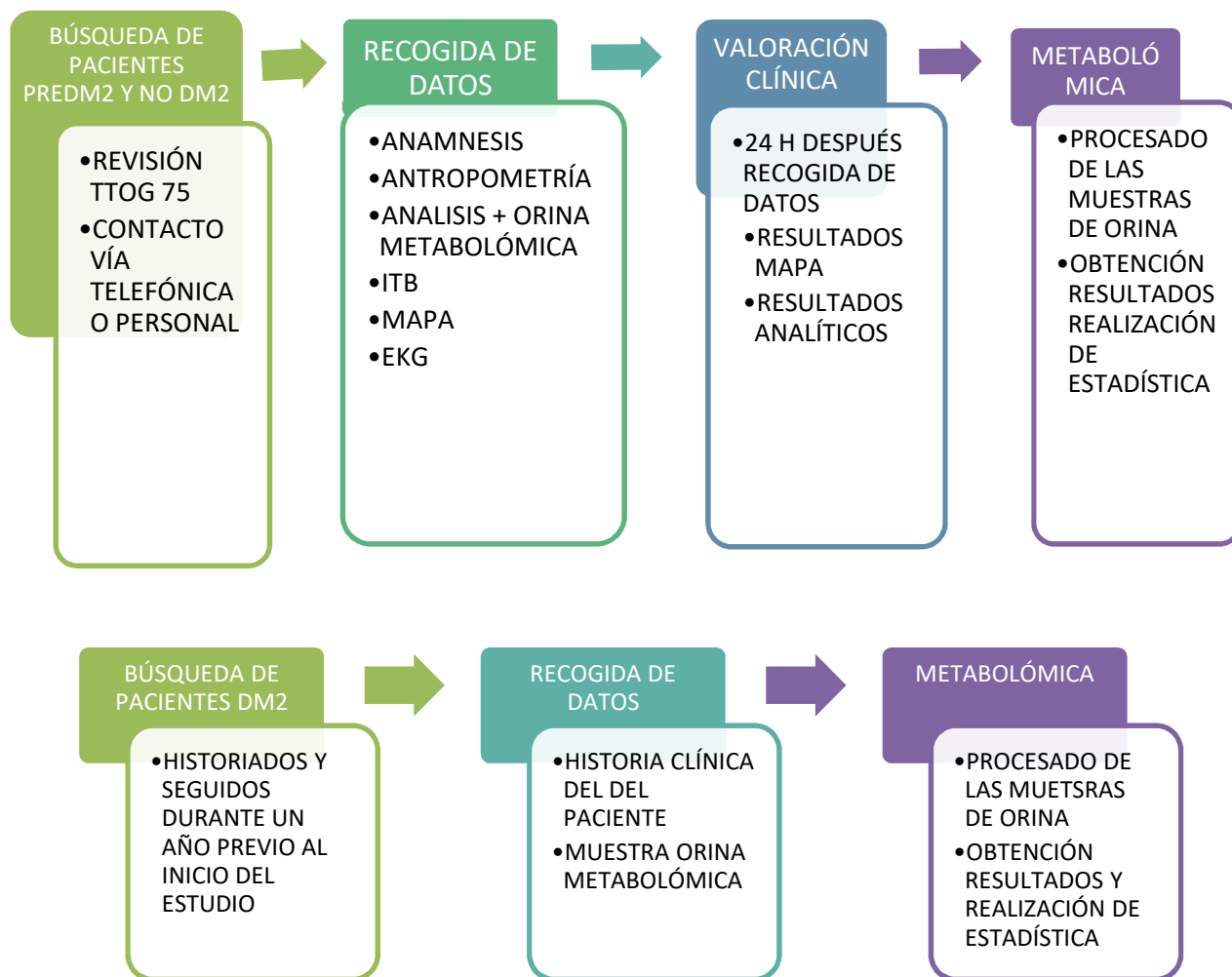
5.3. Procedimientos

Tras contacto telefónico, los participantes fueron citados en el Servicio de Análisis Clínicos para comprobar que los potenciales participantes cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, proceder a lectura de la Hoja de Información al paciente y firma del Consentimiento Informado (ANEXO 1), extracción analítica convencional, realización de TTOG en voluntarios no diabéticos en los que no se había hecho previamente y recogida de muestra de orina para estudio bioquímico convencional y metabolómico.

Ese mismo día los participantes eran valorados en la Consulta Externa de la Unidad de Hipertensión Arterial y Riesgo Cardiometabólico del Servicio de Medicina Interna del Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy, donde se procedió a realizar la valoración clínica, las distintas pruebas antropométricas, medición protocolizada de la presión arterial con sistema automático braquial y triple toma, realización del Índice Tobillo Brazo (ITB), realización de electrocardiograma, colocación de grabadora MAPA (Monitorización ambulatoria de la presión arterial) así como la solicitud de estudio Doppler arterial de troncos supraaórticos por el Servicio de Neurología. Todos estos datos se reunieron en un cuaderno de recogida

de datos (ANEXO 2) para posterior volcado a una base electrónica anonimizada y con acceso acotado a sólo el personal investigador.

CRONOGRAMA



5.4. Variables del estudio

Las variables registradas en el estudio de cada paciente son las que se expresan en la tabla 6.

Tabla 6. Variables del estudio

Variable	Definición	Tipo variable y valores
Datos demográficos		
Edad	Edad en el momento de la inclusión.	Numérica: Años.
Sexo	Sexo del paciente al nacimiento.	Categórica: Varón / mujer.
Años de diabetes	Cálculo desde primera mención del diagnóstico en la historia electrónica.	Numérica: Años.
Antecedentes personales		
Diabetes	Si consta en historia clínica que el paciente tiene diabetes mellitus tipo 2.	Categórica: Sí / No.
Prediabetes	Si en TTOG 75 el paciente cumple Criterios ADA 2021	Categórica: Sí / No.
Normoglucemia	Ausencia en historia clínica del diagnóstico de diabetes y TTOG 75 normal.	Categórica: Sí / No.
Hipertensión arterial (HTA)	Si consta en historia clínica que el paciente tiene hipertensión arterial.	Categórica: Sí / No.
Dislipemia	Si consta en historia clínica que el paciente tiene dislipemia.	Categórica: Sí / No.
Tabaquismo	Estado en el momento de valoración global.	Categórica: Nunca/Exfumador/Activo.
Insuficiencia cardíaca (IC)	Si consta en historia clínica que el paciente tiene insuficiencia cardíaca crónica.	Categórica: Sí / No.
Insuficiencia renal crónica (IRC)	Si consta en historia clínica que el paciente padece insuficiencia renal	Categórica: Sí / No.

	crónica (FGe MDRD4 <60ml/min (1.73 m ²).	
Obesidad	Si consta en Historia clínica que el paciente está obeso o consta IMC >30.	Categórica: Sí / No.
Retinopatía	Si consta en Historia clínica el diagnóstico de retinopatía.	Categórica: Sí / No.
Neuropatía diabética	Si consta en Historia clínica que el paciente tiene una neuropatía diabética.	Categórica: Sí / No.
Evento cardiovascular previo	Si consta en Historia que el paciente ha tenido episodio anginoso y/o ictus previos.	Categórica: Sí / No.
Valoración antropométrica		
Presión arterial sistólica (PAS) clínica	Valor en mmHg de PAS medida mediante sistema semiautomático braquial. Promedio de tres medidas consecutivas.	Numérica: Valor de PAS en mmHg.
Presión arterial diastólica (PAD) clínica	Valor en mmHg de PAD medida mediante sistema semiautomático braquial. Promedio de tres medidas consecutivas.	Numérica: Valor de PAD en mmHg.
Peso	Peso medido en la valoración basal.	Numérica: Kilogramos (Kg).
Talla	Talla medida en la valoración basal.	Numérica: metros (m).
Índice de masa corporal (IMC)	IMC obtenido a partir de peso y talla medidos en la valoración global.	Numérica: Kg/m ²
Perímetro abdominal	Perímetro medido en la valoración basal	Numérica: cm.
Obesidad abdominal	Perímetro de cintura (cm). Hombres ≥102. Mujeres ≥88.	Categórica: Sí/No
Valoración analítica		
Glucemia	Glucemia plasmática en ayunas.	Numérica: mg/dL.
Hemoglobina glicosilada (HbA1c)	Hemoglobina glicosilada plasmática.	Numérica: %

5. Material y métodos

Insulinemia	Insulinemia plasmática obtenida en ayunas.	Numérica: mU/mL
Índice de resistencia insulínica HOMA (<i>Homeostatic model assessment</i>)	Se obtiene con el cálculo: (Glucosa en ayuno (mg/dl) x Insulina en ayuno (μUI/ml)) /405	Numérica: %
Colesterol LDL	Fórmula de Friedewald: Colesterol total – (Colesterol HLD + (Triglicéridos/5))	Numérica: mg/dL.
Colesterol HDL	HDL colesterol plasmático en ayunas	Numérica: mg/dL.
Triglicéridos	Triglicéridos plasmáticos en ayunas	Numérica: mg/dL.
Creatinina plasmática	Creatinina plasmática en ayunas	Numérica: mg/dL.
Lesión de órgano diana y riesgo cardiovascular		
EKG	Trazado electrocardiográfico en el momento de la inclusión o en los seis meses previos	Categórica: Alterado/Normal.
Filtrado glomerular MDRD4	Cálculo FG estimado MDRD4: $186 * sCr - 1,154 * (edad) - 0,203 * 0,742$ (si mujer) o $* 1,212$ (si raza negra)	Numérica: mL/min/1.73 m ²
Excreción urinaria de albúmina (EUA)	Cantidad de microalbúmina en muestra única de orina a primera hora del día.	Numérica: mg/g creatinina.
Microalbuminuria	EUA con valores 30-299 mg/g.	Categórica: Sí/No.
Macroalbuminuria	EUA con valores >299 mg/g.	Categórica: Sí/No.
Índice Tobillo/Brazo (ITB)	Valor del cociente entre PAS de brazo y el de pierna según protocolo ESH. (ITB<0.9: sinónimo de Enfermedad Arterial Obstructiva periférica; ITB <0,9 ó >1,40 ó incompresible indica alto riesgo cardiovascular.	Numérico: Valor del cociente entre valores de PAS.

Grosor íntima media carotídeo	Medición mediante ecografía doppler arterial de carótidas.	Numérica: mm.
Vasculopatía periférica	Claudicación intermitente con ITB alterado.	Categórica: Sí/No.
Síndrome metabólico según criterios ATP-III	Criterios: TG $\geq$ 150 mg/dL, HDLc<40mg/dl en hombres y <50mg/dL en mujeres, PA>130/85mmHg, Glucosa en ayunas >100mg/dL y obesidad abdominal.	Categórica: Sí/No.
Síndrome metabólico según criterios IDF	Criterios: TG $\geq$ 150 mg/dL, HDLc<40mg/dl en hombres y <50mg/dL en mujeres, PA>130/85mmHg, Glucosa en ayunas >100mg/dL y obesidad abdominal.	Categórica: Sí/No.
Puntos Tabla SCORE de riesgo vascular	Puntuación individual según criterios SCORE para España.	Numérica: puntos.
Categoría de riesgo vascular según Escala SCORE	Riesgo muy alto (>10%), alto (5-10%), moderado (1-5%) o bajo (>1%) de fallecer por una causa CV en los siguientes 10 años.	Categórica: Bajo/Moderado/Alto/Muy alto

5.5. Metodología del laboratorio

5.5.1. Análisis convencional

Las condiciones preanalíticas más importantes, previas a la extracción de sangre fueron: ayuno de 8 a 12 horas y seguimiento de las indicaciones del personal de enfermería durante la realización del TTOG 75. En cuanto a la recogida de la muestra de orina, se registró la medicación del paciente previa al análisis metabólico, ya que es un factor que puede alterar el patrón de metabolitos.

La glucemia se ha determinado mediante espectrofotometría de absorción molecular, utilizando 2 reacciones enzimáticas acopladas (hexoquinasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa) en el entorno del sistema analítico Cobas c711 (Roche

Diagnostics®) tanto en el análisis de la glucemia basal en ayunas como para la realización del TTOG 75. El resto de parámetros bioquímicos convencionales, utilizaron la misma plataforma analítica. Los parámetros hormonales se determinaron mediante electroquimioluminiscencia en el sistema analítico Cobas c602 (Roche Diagnostics®). La hemoglobina glicosilada se analizó mediante HPLC (high performance liquid chromatography) en el equipo Adams HA-8180V de Menarini®.

5.5.2. Análisis metabólico

Para el análisis metabólico se ha empleado una muestra de orina en muestra única matutina tras doce horas de ayuno. Posteriormente la muestra se congela a -80°C para su posterior descongelación y análisis metabólico mediante espectroscopía basada en la resonancia magnética de protón (H-NMR). Se añaden 50 µl tampón KH_2PO_4 ([TSP]=0,787mM en D_2O) a 450 µl de orina en un tubo de 5 mm para H-NMR.

Los espectros de H-NMR obtenidos se registran utilizando el espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Bruker GmbH®, Rheinstetten, Germany). La medición se realiza a 37° C. A todas las muestras se les aplica un único pulso de presaturación. Se utiliza como referencia en el espectro un doblete de hipurato a 7.83 ppm. La región de desplazamiento químico empleada para el proyecto, incluye un espectro de frecuencias con resonancias entre 0.50 y 4.20 ppm. Las muestras se procesaron de forma aleatoria y sin saber a qué grupo pertenecían.

Los espectros se normalizan con el área total de carbonos alifáticos para eliminar diferencias en la concentración total de metabolitos, obteniendo unos valores en unidades arbitrarias. Los espectros se agrupan en paquetes de 0.01 ppm y son centralizados en el análisis multivariado. Para minimizar el ruido de fondo, el espectro se reduce a 98 regiones en base a su ganancia en metabolitos. Se utiliza la integración del área del pico para calcular la cantidad relativa del metabolito. Las señales que pertenecen a las regiones seleccionadas se cuantifican utilizando la integración y el ensamblaje de los picos mediante el programa propio semiautomático, MATLAB 6,5 (The Math Works Inc®, Natick, Massachusetts). La cuantificación se realiza sólo en las regiones espectrales que contienen

contribuciones de un solo o como máximo dos metabolitos. Para el resto de metabolitos, la cuantificación está comprometida debido al solapamiento y la baja intensidad de las señales.

A partir de los espectros se identificaron 39 regiones de posibles metabolitos, procediendo a la normalización de dichas regiones por mediana y con autoescalado (centrado en la media y dividido por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable). Con la normalización de los datos lo que se persigue es reducir la variabilidad técnica sin eliminar la variabilidad biológica.

La reproducibilidad de la técnica de H-NMR se prueba mediante el ensayo de superposición de espectros normalizados de orina. Para la anotación de los metabolitos que son significativos se necesita la identificación de sistemas completos de spin a partir del análisis de los experimentos bidimensionales de H-NMR, incluyendo la espectroscopía de correlación homonuclear (TOCSY) y la espectroscopía de correlación cuántica única heteronuclear (HSQC), las cuales proporcionan correlaciones estadísticas entre las variables de H-NMR que sugieren una conexión estructural o biológica. El procedimiento para la asignación de metabolitos utiliza el conocimiento de las bases de datos generales de espectros, como HMDB 20®, así como bases de datos patentadas (Chenomx RMN Suite 4.5®).

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. Análisis descriptivo de la muestra

Se han empleado medias y desviación típica como medidas de tendencia central y dispersión de las variables cuantitativas con distribución normal. En las variables cuantitativas con distribución no normal se han empleado la mediana y rango intercuartílico (IQR). Números absolutos y porcentajes en las cualitativas. Para el análisis de la normalidad se ha empleado el test de Kolmogorov-Smirnov. Para los contrastes de hipótesis se ha empleado la t de Student (comparación dos grupos) o la ANOVA (comparación más de dos grupos) para las variables cuantitativas con distribución normal y pruebas paramétricas para las que no tenían distribución normal. Los análisis estadísticos se han realizado mediante el software estadístico SPSS 15.0®.

5.6.2. Análisis estadístico metabólico

Los análisis estadísticos quimiométricos se han realizado utilizando el programa *MetaboAnalyst 5.0*.

El primer paso consistió en un análisis univariado (ANOVA con prueba *post hoc*, que en nuestro estudio utilizamos *Bonferroni* y *Fisher*) entre los grupos glucémicos para visualizar las diferencias entre grupos de datos, reduciendo los datos multidimensionales a dos o tres variables. Además, las diferencias entre los grupos de pacientes se pueden caracterizar por un grupo de relaciones de metabolitos en lugar de un solo metabolito. En la prueba de *Fisher*, además, se controla el FDR (*false discovery rate*) cuyo objetivo es establecer un límite de significancia para un conjunto de test tal que, de entre todos los test considerados como significativos, la proporción de hipótesis nulas verdaderas (falsos positivos) no supere un determinado valor.

Seguidamente se realizó el análisis multivariado de los componentes principales (PCA) de cada muestra, que consiste en una reducción rutinaria de datos multivariados no supervisados que sirve para evaluar de forma rápida la distribución de los datos y la similitud intermuestra (por ejemplo, asociaciones y valores atípicos). PCA es una herramienta analítica no supervisada que proporciona una visión general de los datos a través de un análisis de la estructura de la covarianza, destacando patrones atípicos y patrones de agrupamiento. Los componentes principales se representan uno frente a otro. Esencialmente, se crean nuevas variables (componentes principales) basadas en la varianza resultante entre los perfiles de metabolitos, entre las muestras y las muestras que se representan como nuevas variables, que actúan como ejes x e y, y ocasionalmente como eje z. De esta manera, las muestras que son similares se agrupan y las que son diferentes se separan. Se puede superponer una medida de distribución, similar a la distribución gaussiana, para identificar aquellas muestras que están fuera del nivel de confianza del 95%, clasificándolas como valores atípicos ya que probablemente contengan un nivel anormalmente alto o bajo de un metabolito en particular, lo que hace que no sean representativos de ningún grupo (58).

Después del PCA, se hizo un análisis parcial por mínimos cuadrados (PLS-DA, del inglés: *Partial Least Squares–Discriminant Analysis*) para construir un modelo

estadístico que permita optimizar la separación entre grupos poblacionales objeto de estudio, en nuestro caso entre pacientes nG, pDm, y Dm. PLS-DA es un método analítico supervisado que relaciona los datos de los metabolitos con los miembros de su misma clase, lo que permite dilucidar la separación entre los grupos. Al igual que con el PCA, cada muestra se distribuye en un espacio n-dimensional en función de su perfil metabólico, pero en el lugar de la variación entre muestras, es la variación entre los grupos lo que permite la elucidación de las diferencias de variables entre los grupos (58).

Los modelos quimiométricos multivariados utilizan para la validación cruzada *Venetian blind* con 10 iteraciones, de tal manera que en cada desarrollo el 10% de los resultados se quedarán fuera del ensayo. Los resultados de la validación cruzada se evaluaron mediante los parámetros Q² (R²CV), y el error medio cuadrático de la validación cruzada (RMSCV), donde Q² es el coeficiente de correlación media entre la variable dependiente y las predicciones de PLS-DA y proporciona una medida de la precisión de la predicción durante el proceso de validación cruzada (valores más altos son indicativos de mejor predicción). El RMSCV se calcula como la medida más adecuada del sobreajuste. A partir de estos datos se realizaron las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

En un segundo paso se construyeron diagramas de caja (BOXPLOT) y calcularon los VIP *scores* de los metabolitos obtenidos en el paso previo de validación cruzada. En los diagramas de caja se representan los cuartiles (Q), la mediana y los valores atípicos de cada variable. El tamaño de cada caja viene definido por el Q1 y el Q3, y la distancia entre ellos corresponde al IQR. Los VIP *scores* (VIP) estiman la importancia de cada variable en la proyección utilizada en un modelo PLS-DA y se utilizan para la selección de variables que más discriminan entre dos o más modelos. Una variable con un puntaje VIP cercano o mayor a 1 se puede considerar importante en un modelo dado. Las variables con puntajes VIP significativamente menores a 1 son menos importantes y podrían ser buenos candidatos para la exclusión del modelo.

Finalmente, se contruyó una matriz de confusión y un análisis de correlación de metabolitos mediante mapas de calor. Para la matriz de confusión se utilizaron todos los datos (resultados del modelo) y sólo los resultados de la validación

cruzada (resultados VC). En los resultados de la VC se utilizaron grupos de datos para validar internamente el modelo a falta de otra cohorte para validarlo externamente. Se realiza la matriz de confusión para establecer la capacidad de predicción del modelo. En el análisis de correlación de los metabolitos, se realizó una correlación de los 39 metabolitos con respecto a los 39 mismos metabolitos cuyo mapa de calor indica las correlaciones que existen entre los distintos metabolitos. A estas correlaciones se les asigna un valor y un color en base a una escala, que en este caso va del 1 al -1, siendo el rojo intenso el 1, el 0 el blanco y el -1 el azul intenso. Cuando se correlacionan los dos mismos metabolitos se obtiene un valor de correlación de 1 con un color rojo intenso. Una correlación positiva (color rojo) nos indica que van en la misma dirección; por ejemplo, podría ser que pertenezcan a la misma ruta metabólica. El análisis de correlación se puede utilizar para visualizar las correlaciones generales entre diferentes características. Tras el estudio de las correlaciones entre los grupos glucémicos, observamos la tendencia de algunos metabolitos y elaboramos gráficas con las medias y las desviaciones típicas de las unidades arbitrarias de dichos metabolitos para poder visualizar de manera gráfica la tendencia.

5.7. Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado con fecha 28 de febrero de 2014, por el Comité Ético de Investigación (CEI) del Departamento de Salud de Alcoy (Anexo 3).

Los datos recogidos en la base de datos electrónica del estudio fueron anonimizados, de forma que en la base de datos no hubo ningún dato identificativo de los pacientes, y solo los investigadores principales y colaboradores dispusieron de éstos a través de un sistema de codificación mediante tabla de doble entrada.

Todos los participantes en el presente estudio firmaron el Documento de Consentimiento Informado (Anexo 1) tras lectura de la Hoja de Información del estudio presente en el mismo. A pesar de la posibilidad de retirada del estudio en cualquier momento del mismo, tras la firma del Consentimiento Informado y sin necesidad de ningún tipo de justificación, ningún participante retiró el consentimiento.

El estudio ha cumplido con las recomendaciones éticas y de confidencialidad del Reglamento UE 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de protección de datos (RGPD), las normas de la Declaración de Helsinki y ha seguido las Normas de la Buena Práctica Clínica y las bases de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

6. RESULTADOS

6.1. Características de la muestra

Se ha incluido un total de 136 participantes, de ellos 78 diabéticos (grupo Dm), además de 32 y 26 con criterios ADA de normoglucemia (Grupo nG) y prediabetes (Grupo pDm) tras test de carga oral con 75 g de glucosa (TTOG), respectivamente.

Las características clínicas principales de cada grupo aparecen expresadas en la tabla 7. Existen diferencias significativas ($p^* < 0,05$) entre los tres grupos de estudio (nG, pDm y Dm) en las variables edad, HbA1c, glucemia, colesterol HDL, triglicéridos, ácido úrico, urea, sodio, potasio, cociente albúmina/creatinina en orina, TFG, HTA, dislipidemia, obesidad, IRC, ICC, vasculopatía EEII y AVC previo. En otras variables estudiadas sólo en los grupos de pDm y nG también existen diferencias significativas, como en el caso del HOMA e IMC.

Tabla 7. Características de la muestra

Variable	nG (n 32)	pDm (n 26)	Dm (n 78)	p*
EDAD (años)	47 (29-59)	46 (32-67)	69 (48-86)	0,000
SEXO (M/F)	11 / 21	10 / 16	40 / 38	0,210
Pruebas analíticas				
HbA1c (%)	5,3 (4,8-6,0)	5,5 (4,8-6,1)	7,1 (5,6-12,5)	0,000
Glucemia (mg/dL)	91 (80-110)	101 (86-123)	142 (83-307)	0,000
Insulinemia (mU/mL)	6,8 (2,7-14,0)	10,9 (3,8-68,5)	-	0,077
HOMA (Glu*Ins /405)	1,52 (0,6-3,6)	2,8 (0,8-18,9)	-	0,048
RI (HOMA > 3.8)(91)	0	19,2	-	
Péptido C (ng/mL)	2,09 (1,2-3,6)	2,6 (1,3-8,9)	-	0,090
Colesterol total (mg/dL)	182 (125-242)	174 (112-235)	177 (131-426)	0,676
Colesterol LDL (mg/dL)	102 (30-164)	96 (53-147)	99 (57-256)	0,739
Colesterol HDL (mg/dL)	63 (48-82)	57 (36-101)	54 (28-103)	0,003
Triglicéridos (mg/dL)	84 (36-180)	100 (37-271)	129 (39-744)	0,017
Ácido Úrico (mg/dL)	4,2 (2,9-6,3)	4,8 (2,6-7,0)	5,3 (2,2-9,2)	0,001
Creatinina (mg/dL)	0,79 (0,47-1,10)	0,75 (0,52-1,00)	0,91 (0,47-2,04)	0,460
Urea (mg/dL)	31 (20-42)	31 (17-47)	40 (19-77)	0,000
Na ⁺ (mEq/L)	139 (137-143)	140 (136-145)	141 (136-145)	0,001
K ⁺ (mEq/L)	4,4 (3,8-5,3)	4,4 (3,7-4,9)	4,6 (3,5-5,9)	0,003
Albúmina/Creatinina	6,7	29,2	45,5	0,000

6. Resultados

urinaria (mg/g)	(0-52)	(2,0-473,0)	(0,0-1954,2)	
Tasa Filtrado Glomerular MDRD (mL/min)	90 (68-141)	94 (76-122)	80 (29-138)	0,000
Pruebas antropométricas				
Peso (Kg)	70,6 (51,0-90,2)	72,3 (44,0-105,6)	-	0,655
Talla (m)	1,65 (1,45-1,82)	1,63 (1,45-1,80)	-	0,593
IMC (Kg/m2)	26 (20-35)	27 (19-35)	-	0,004
Masa grasa (%)	32,8 (19,9-49,9)	32,9 (16,0-48,5)	-	0,763
Brazo Derecho (cm)	28 (24-33)	29 (22-35)	-	0,200
Brazo Izquierdo (cm)	28 (24-35)	29 (21-34)	-	0,267
Cintura (cm)	89 (77-104)	93 (71-119)	-	0,098
ITB derecho	1,13 (0,6-1,41)	1,13 (0,97-1,35)	-	0,937
ITB izquierdo	1,3 (0,9-1,36)	1,12 (0,94-1,36)	-	0,645
Patologías				
Antecedentes familiares de Diabetes	43,75	65,38	-	0,070
HTA	12,5	23,1	75,64	0,000
Dislipidemia	12,5	11,53	84,61	0,000
Obesidad	18,75	34,61	80,77	0,000
Insuficiencia Renal Crónica	0	0	25,64	0,000
Insuficiencia Cardíaca Crónica	0	0	21,79	0,001
Vasculopatía EEII	0	0	30,77	0,000
Vasculopatía carotídea	0	0	0	-
AVC previo	0	3,85	12,82	0,055

Valores expresados como porcentajes o media (Desviación típica). nG: Normoglucémicos. pDm: Prediabéticos. Dm: Diabéticos. HOMA: Homeostasis Model Assesment. IMC: Índice de masa corporal. ITB: Índice tobillo/brazo. HTA: Hipertensión arterial. AVC: Accidente cerebral vascular. P*: Comparativo entre categorías glucémicas.

6.2. Resultados análisis metabólico

6.2.1. Análisis de los espectros

Se analizaron las 136 muestras de orina y se obtuvieron los respectivos espectros solapados, como se observa en la figura 29.

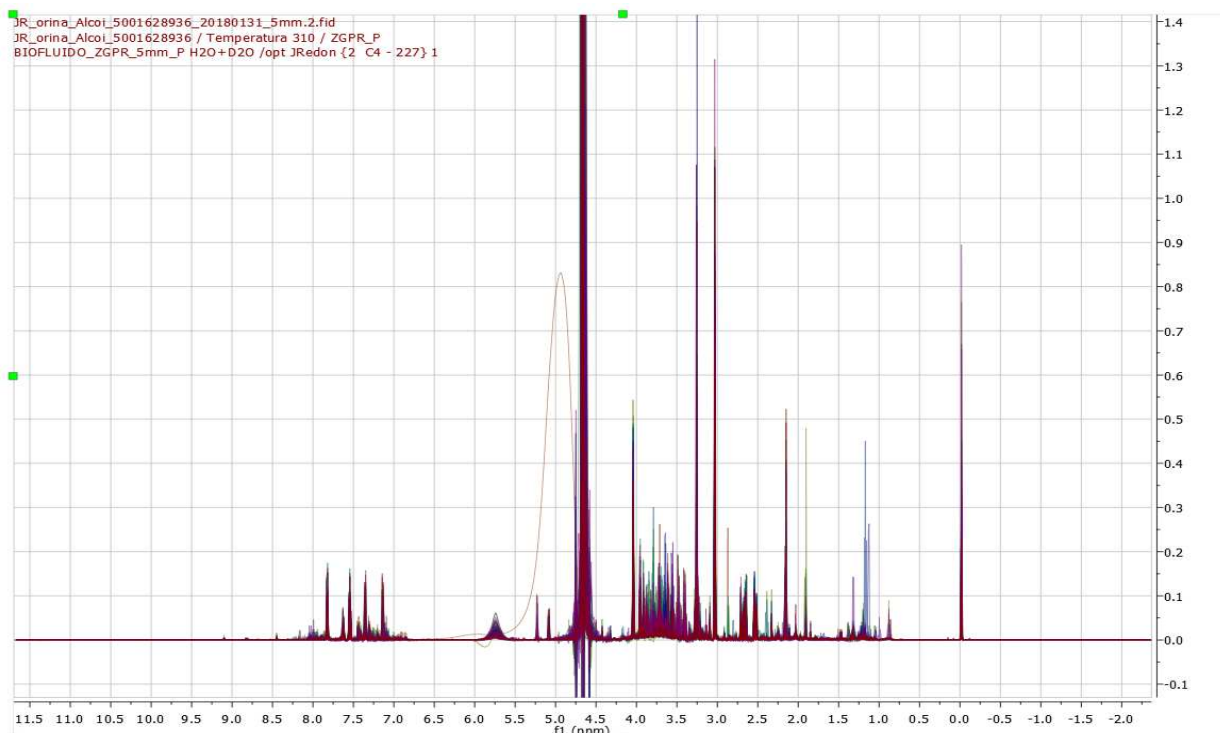


Figura 29: Espectros solapados de H-NMR de las 136 muestras de orina.

A partir de los espectros se identificaron 39 regiones de posibles metabolitos, procediendo a la normalización de dichas regiones (figura 30). Los 39 metabolitos identificados fueron: leucina, 3-metil-oxovalerato, 3-hidroxioxovalerato, 2-hidroxibutirato, alanina, 2-aminoadipato, acetato, N6-acetilisina, prolina, acetona, acetoacetato, 3-hidroxibutirato, piruvato, glutamato, citrato, dimetilamina, glutatión, lisina, cis-aconitato, malonato, N-nitrosodimetilamina, tirosina, colina, glicerol-3-fosfocolina, metanol, etanol, creatinfosfato, creatinina, mioinositol, lactato, treonina, trigonelina, urea, xantosina, 3-indoxisulfato, fenilalanina, hipurato, metilhistidina y formato.

En la figura 30 se representa las regiones de metabolitos en diagramas de caja y diagramas de densidad de grano antes y después de la normalización por mediana y con autoescalado (centrado en la media y dividido por la raíz cuadrada

6. Resultados

de la desviación estándar de cada variable). Los diagramas de caja muestran como máximo 50 características debido al límite de espacio mientras que los diagramas de densidad se basan en todas las muestras.

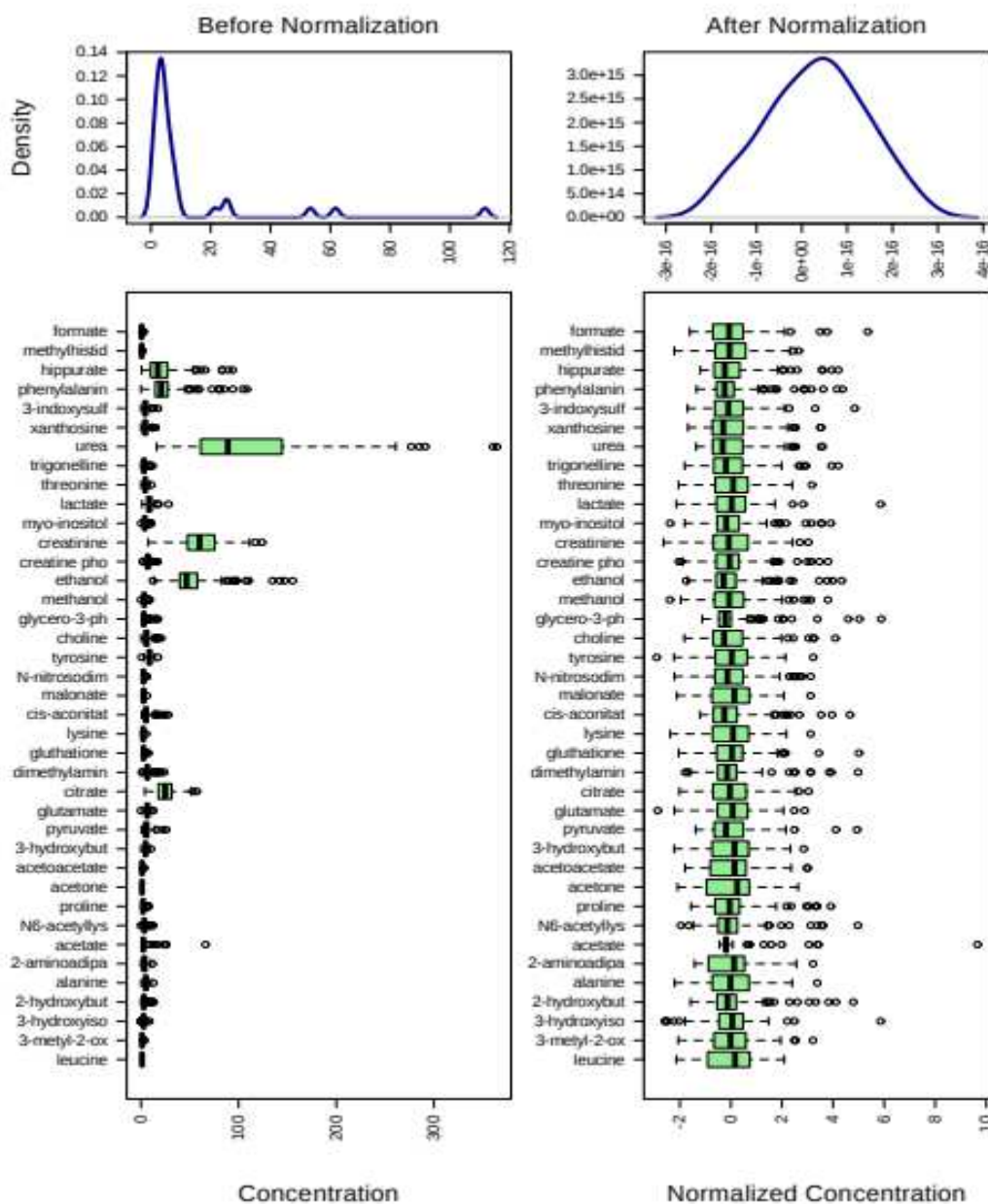


Figura 30: Diagramas de caja y diagramas de densidad de grano antes y después de la normalización. Métodos seleccionados: Normalización por filas: N / A: Información de datos: N / A: Escala de datos: Autoescalado.

6.2.2. Distribución de metabolitos por categorías glucémicas. Análisis univariado.

Se ha realizado el análisis estadístico inicial con las 39 regiones de metabolitos del análisis ajustado de espectros en el total de participantes agrupados por las categorías glucémicas preestablecidas observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo Dm con respecto de los participantes nG y pDm. En la tabla 8 están representados los 39 metabolitos inicialmente identificados en función de los tres grupos diagnósticos glucémicos considerados. Podemos observar tras el análisis *post hoc* de *Bonferroni*, que para el grupo Dm hay diferencias significativas en 15 de los metabolitos respecto del resto de categorías glucémicas (leucina, lisina, malonato, colina, etanol, trigonelina e hipurato, 3-metil-2-oxovalerato, cis-aconitato y creatinfosfato, glutamato, citrato, dimetilamina, tirosina y creatinina). A su vez, en el grupo de pDm se observan diferencias significativas con respecto al nG y al Dm en el metabolito colina.

6. Resultados

Tabla 8. Comparativa mediante test de *Bonferroni* entre grupos glucémicos de las 39 regiones de metabolitos identificadas con el análisis de espectros.

	CTL			PRE-DM2			DM2		
	Media	Desviación estándar	N total	Media	Desviación estándar	N total	Media	Desviación estándar	N total
Leucine	1.27	0.50	32.00	1.28	0.48	26.00	0.99*	0.51	87.00
3-metyl-2-oxovalerate	1.45	0.65	32.00	1.30	0.44	26.00	1.07**	0.55	87.00
3-hydroxyisovalerate	2.74	0.82	32.00	3.01	1.39	26.00	2.49	0.92	87.00
2-hydroxybutyrate	3.26	1.78	32.00	2.83	1.18	26.00	3.36	2.33	87.00
Alanine	5.37	2.36	32.00	5.37	1.72	26.00	4.75	2.29	87.00
2-aminoadipate	3.86	2.54	32.00	3.49	1.84	26.00	3.56	2.73	87.00
Acetate	2.47	0.64	32.00	2.26	0.54	26.00	4.41	8.21	87.00
N6-acetyllysine	3.55	1.56	32.00	3.19	1.03	26.00	3.78	2.00	87.00
Proline	2.24	1.35	32.00	2.00	0.94	26.00	2.26	1.55	87.00
Acetone	1.08	0.48	32.00	1.08	0.43	26.00	0.99	0.51	87.00
Acetoacetate	1.03	0.53	32.00	1.00	0.56	26.00	1.10	0.63	87.00
3-hydroxybutyrate	4.51	1.85	32.00	4.34	1.58	26.00	4.43	2.16	87.00
Pyruvate	6.39	3.23	32.00	5.69	3.13	26.00	5.86	4.51	87.00
Glutamate	7.45	1.89	32.00	7.50	1.52	26.00	5.50***	2.11	87.00
Citrate	29.81	9.48	32.00	27.42	9.88	26.00	22.92**	10.46	87.00
Dimethylamine	8.81	4.25	32.00	7.77	3.99	26.00	6.32***	2.46	87.00
Glutathione	2.64	1.04	32.00	2.57	0.76	26.00	2.65	1.04	87.00
Lysine	2.47	0.77	32.00	2.59	0.82	26.00	2.04*	0.97	87.00
Cis-aconitate	4.65	2.50	32.00	4.38	2.06	26.00	7.38**	5.39	87.00
Malonate	2.96	0.97	32.00	2.86	0.68	26.00	2.43*	1.17	87.00
N-nitrosodimethylamine	2.90	0.64	32.00	2.75	0.83	26.00	2.48	1.06	87.00
Tyrosine	9.84	1.92	32.00	10.08	2.61	26.00	7.63***	2.61	87.00
Choline	6.96	2.69	32.00	8.92*	5.18	26.00	5.34*	2.54	87.00
Glycero-3-phosphocholine	2.89	0.59	32.00	3.97	1.85	26.00	3.45	2.84	87.00
Methanol	3.38	1.12	32.00	2.95	1.12	26.00	3.61	1.59	87.00
Ethanol	46.65	12.60	32.00	42.06	9.30	26.00	58.99*	27.36	87.00
Creatine phosphate	8.11	2.12	32.00	9.00	3.54	26.00	6.41**	1.97	87.00
Creatinine	74.40	16.88	32.00	71.27	21.91	26.00	54.49***	17.94	87.00
Myo-inositol	3.65	1.02	32.00	3.88	0.95	26.00	4.31	1.90	87.00
Lactate	9.09	2.95	32.00	8.25	2.33	26.00	8.30	3.78	87.00
Threonine	4.37	1.96	32.00	4.88	1.86	26.00	3.89	2.06	87.00
Trigonelline	4.16	2.48	32.00	3.38	1.92	26.00	3.24*	1.63	87.00
Urea	118.36	74.51	32.00	111.77	66.54	26.00	109.47	70.88	87.00
Xanthosine	5.10	2.88	32.00	4.84	2.66	26.00	4.67	2.92	87.00
3-indoxysulfate	5.03	2.13	32.00	4.60	2.11	26.00	4.29	2.93	87.00
Phenylalanine	24.38	14.60	32.00	19.69	7.91	26.00	27.55	22.10	87.00
Hippurate	28.12	19.84	32.00	21.37	19.68	26.00	18.98*	15.00	87.00
Methylhistidine	0.83	0.28	32.00	0.81	0.40	26.00	0.68	0.32	87.00
Formate	0.68	0.27	32.00	0.61	0.20	26.00	0.58	0.44	87.00

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

En la tabla 9 se recogen los resultados obtenidos del análisis *post hoc* de *Bonferroni* clasificando los metabolitos con diferencias significativas, entre las categorías glucémicas, en función del grupo metabólico al que pertenecen, comprobándose que los metabolitos que más abundan en el total de la muestra estudiada son los aminoácidos, seguido de los ácidos orgánicos y los organonitrogenados.

Tabla 9. Diferencias significativas de metabolitos entre diabéticos y no diabéticos (nG+pDm). Análisis univariado.

Valor-p*	AMINOÁCIDOS	ÁCIDOS ORGÁNICOS	ALCOHOLES Y ALCALOIDES	ORGANONITROGENADOS
p<0,05	↓ Leucina ↓ Lisina	↓ Malonato ↓ Hipurato	↑ Etanol ↓ Trigonelina	↓ Colina
p<0,01	↓ 3-Metil-2-Oxovalerato	↑ Cis-Aconitato		↓ Creatinfosfato
p<0,001	↓ Glutamato ↓ Tirosina	↓ Citrato		↓ Dimetilamina ↓ Creatinina

*: Comparativo entre categorías glucémicas. Comparativo DM vs no diabéticos (pDm+nG). ↓: Niveles disminuidos en diabéticos respecto de no diabéticos. ↑: Niveles aumentados en diabéticos respecto de no diabéticos.

Se ha completado el análisis univariado con el test de *Fisher* (tabla 10) para estimar la tasa de falsos hallazgos (*False Discovery Rate*, FDR) identificándose doce metabolitos con diferencias significativas entre el grupo Dm y los otros dos grupos glucémicos (leucina, lisina, 3-metil-2-oxovalerato, cis-aconitato, glutamato, citrato, dimetilamina, etanol, tirosina, colina, creatinfosfato y creatinina). También entre el grupo pDm y Dm excepto para 3-metil-2-oxovalerato. De entre los no diabéticos, como ya ocurriera en la prueba *post hoc* de *Bonferroni* previa, se detectaron diferencias significativas entre nG y pDm en el metabolito colina.

Tabla 10. Distribución de metabolitos por categorías glucémicas (1: nG; 2: pDm; 3: Dm) tras análisis de *Fisher*.

	f.value	p.value	-log10(p)	FDR	Fisher's LSD
creatinine	17159	2.1622e-07	6.6651	4.3426e-06	1 - 3; 2 - 3
glutamate	17123	0.0002227	6.6523	4.3426e-06	1 - 3; 2 - 3
tyrosine	15.02	1.2315e-06	5.9096	0.01601	1 - 3; 2 - 3
creatine phosphate	14636	1.6909e-06	5.7719	1.6486e-05	1 - 3; 2 - 3
choline	13272	5.2704e-06	5.2782	4.1109e-05	2 - 1; 1 - 3; 2 - 3
dimethylamine	7.4059	0.00087637	3.0573	0.0053346	1 - 3; 2 - 3
ethanol	7308	0.00095749	3.0189	0.0053346	3 - 1; 3 - 2
cis-aconitate	7.0198	0.0012436	2.9053	0.0060626	3 - 1; 3 - 2
3-metyl-2-oxov alerate	5.9196	0.0034047	2.4679	0.013521	1 - 3
citrate	5.9	0.003467	2.46	0.013521	1 - 3; 2 - 3
leucine	5.3912	0.0055518	2.2556	0.019684	1 - 3; 2 - 3
lysine	5.0629	0.0075352	2.1229	0.024489	1 - 3; 2 - 3

6.2.3. Análisis PCA (*Principal Component Analysis*) y PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*)

En un segundo paso, se han realizado los análisis PCA (figura 31) y PLS-DA (figura 32) comparando los tres grupos glucémicos del estudio. Como se puede observar en la figura 31, se produce una separación entre grupos glucémicos, con desplazamiento del grupo Dm hacia la izquierda y abajo respecto de las otras dos categorías glucémicas, comportamiento que no se corresponde a grupos de sexo u otras categorías de la muestra.

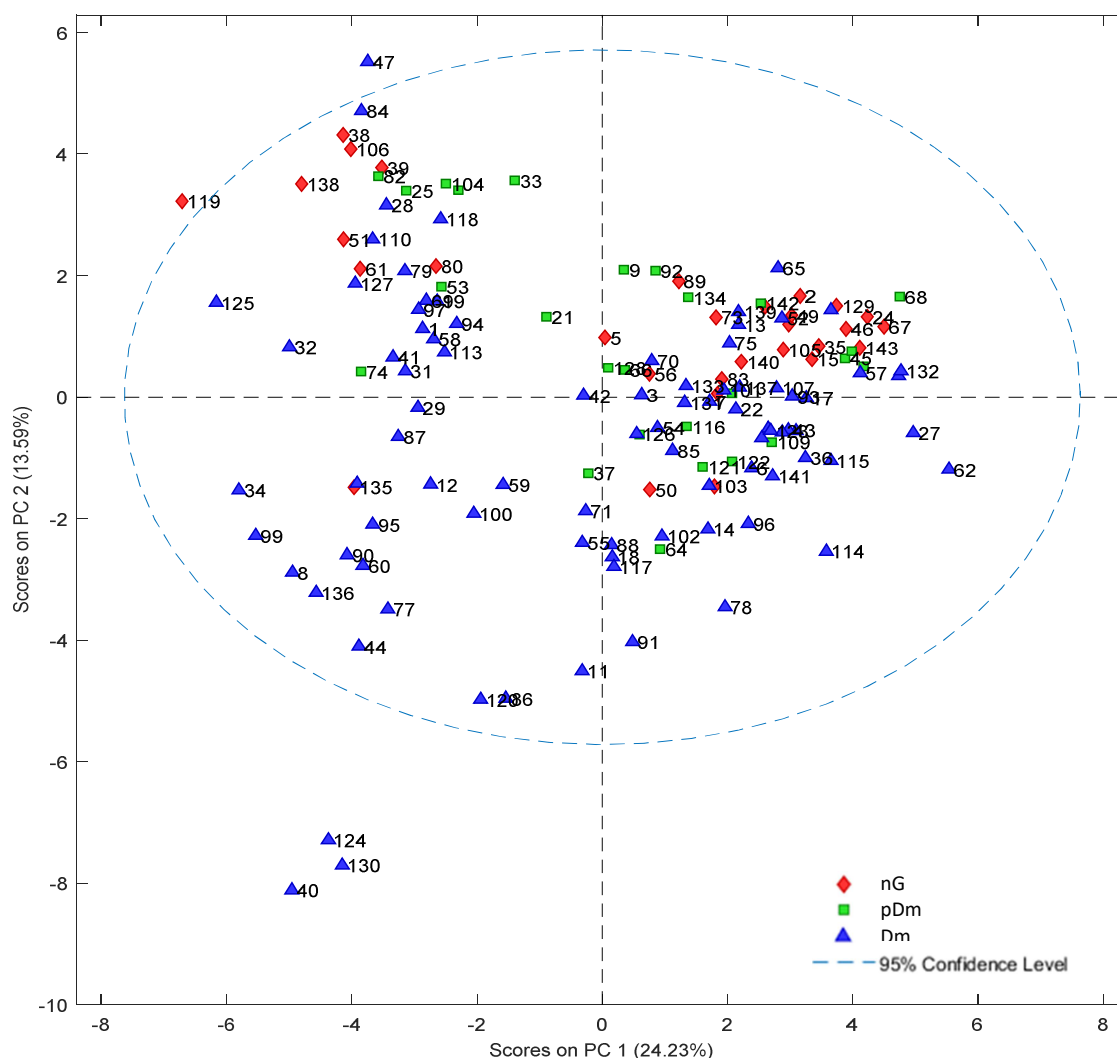


Figura 31: Análisis PCA (*Principal Component Analysis*). nG: normoglucémicos; pDm: Prediabéticos; Dm: Diabéticos. PC: *Principal Component*.

A continuación, en la figura 32, que representa el análisis PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*), se observa cómo el grupo Dm y el nG se separan muy bien entre ellos, observando un comportamiento del grupo pDM más similar al grupo nG.

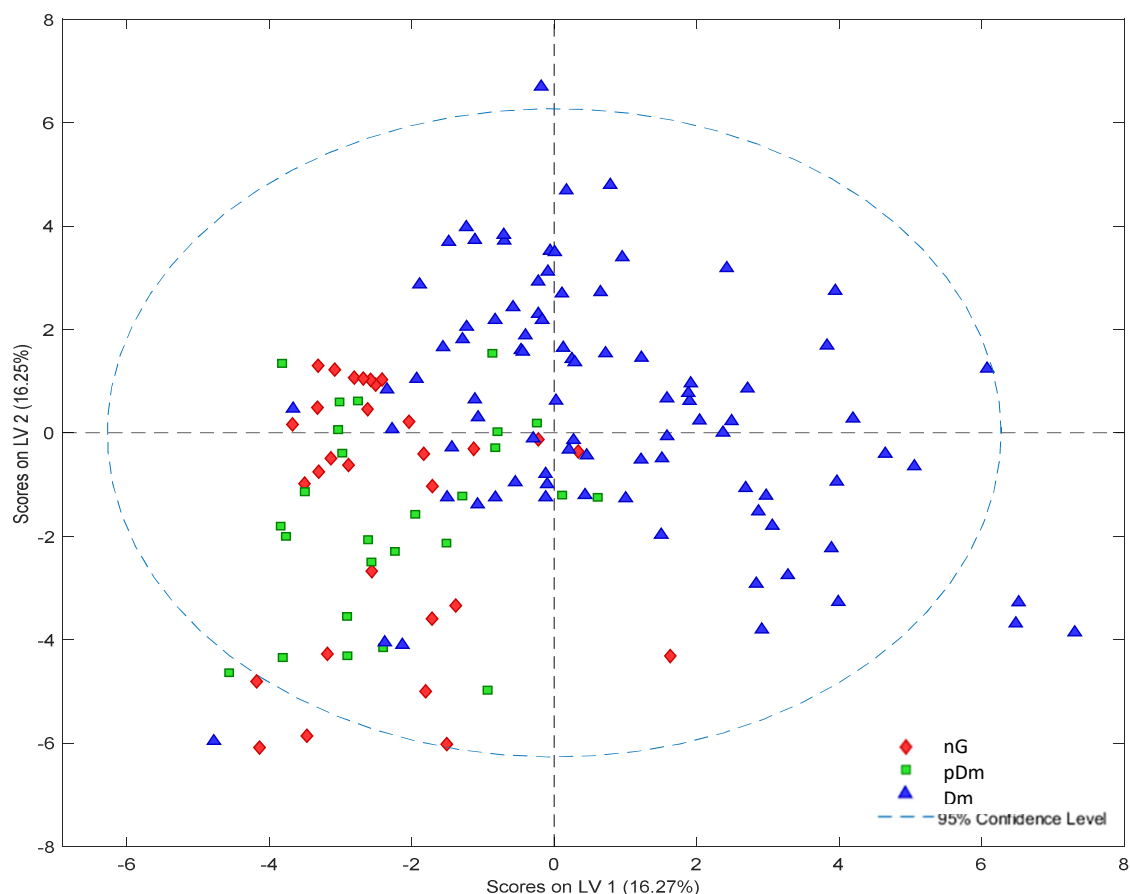


Figura 32: Análisis PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*). nG: normoglucémicos; pDm: Prediabéticos; Dm: Diabéticos.

Se ha realizado la validación estadística del modelo PLS-DA mediante análisis de 50 permutaciones (datos no incluidos), con resultados estadísticamente significativos del modelo para el grupo Dm. Así, se calculó la probabilidad entre el modelo de insignificancia y las muestras permutadas (validación cruzada), con tres componentes: Wilcoxon, Sign Test y Rand t-test. Los resultados de predicción de los tres componentes para el grupo de Dm han sido: Wilcoxon ($p=0,000$); Sign Test ($p=0,000$); Rand t-test ($p=0,005$).

6. Resultados

La figura 33 se corresponde a las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) del modelo para Dm y pDm obtenidas a partir del modelo de clasificación (C), con todos los datos obtenidos, y a partir de la validación cruzada (VC), en la cual, como ya se ha comentado con anterioridad, a partir del modelo de clasificación se quitan cada vez 10 datos, se realiza un nuevo modelo y se valida con esos 10 datos.

Las curvas ROC para Dm muestran muy buena capacidad de predicción del modelo. La línea azul corresponde a la curva ROC del C, con un área bajo la curva (AUC) de 0,984, y la línea verde corresponde a los datos de la VC con un AUC de 0.9308. Se puede observar que las curvas no presentan apenas sobreajuste. En las curvas ROC para los pDm podemos observar que la ROC del C (línea azul) tienen un AUC de 0,91, con una muy buena capacidad de predicción, mientras que la ROC de la CV (línea verde) tiene un AUC de 0.7558, con una buena capacidad de predicción, aunque con sobreajuste.

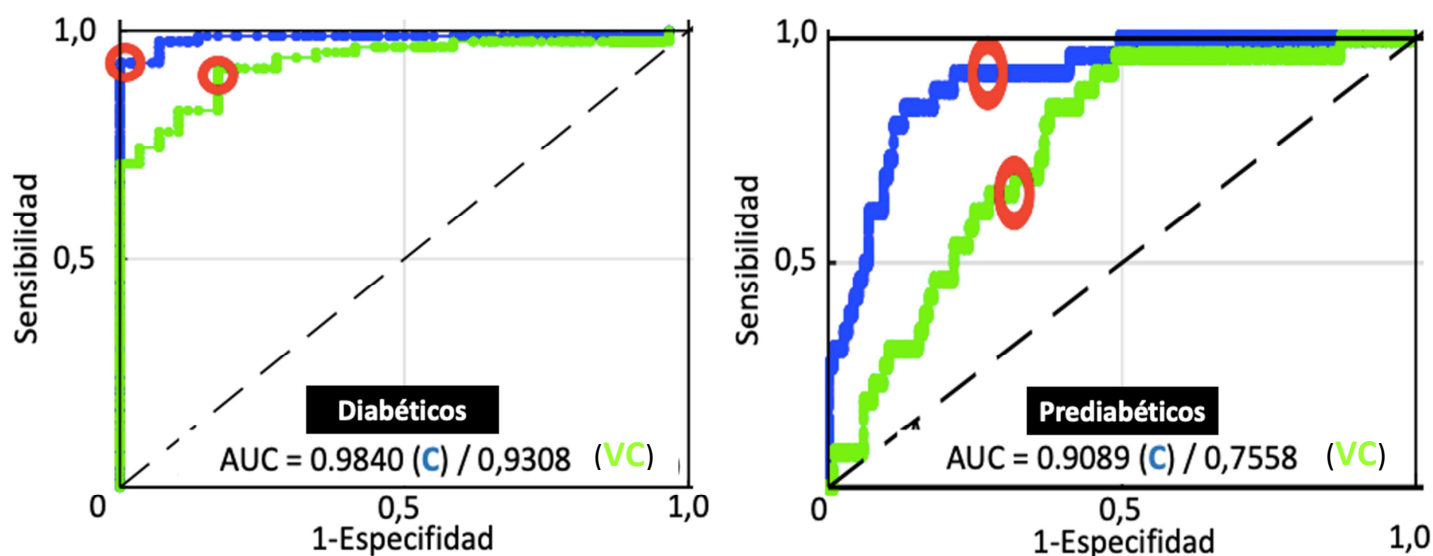


Figura 33: Curvas ROC Dm y pDM. La línea azul representa el modelo de clasificación (C) mientras que la línea verde representa la validación cruzada (VC).

6.2.4. VIP SCORES (*Variable Importance Plot*) y BOXPLOT (Diagrama de Cajas)

Se estimaron los valores de los *Variable Importance Plot* (VIP scores), que aparecen representados en la figura 34. En el eje de las y, a la izquierda, los 15

metabolitos más representativos y a la derecha la forma gráfica de representar la proporción en la que se encuentra cada metabolito en cada uno de los tres grupos glucémicos, que se representa de mayor a menor según escala de colores, correspondiendo el color rojo a la máxima, el color verde a la menor y el color amarillo a una intensidad intermedia. En el eje de las x se representa el valor de los VIP scores, que va desde 1 a 2, considerándose que un metabolito con un VIP scores >1 contribuye de forma importante a la separación entre grupos.

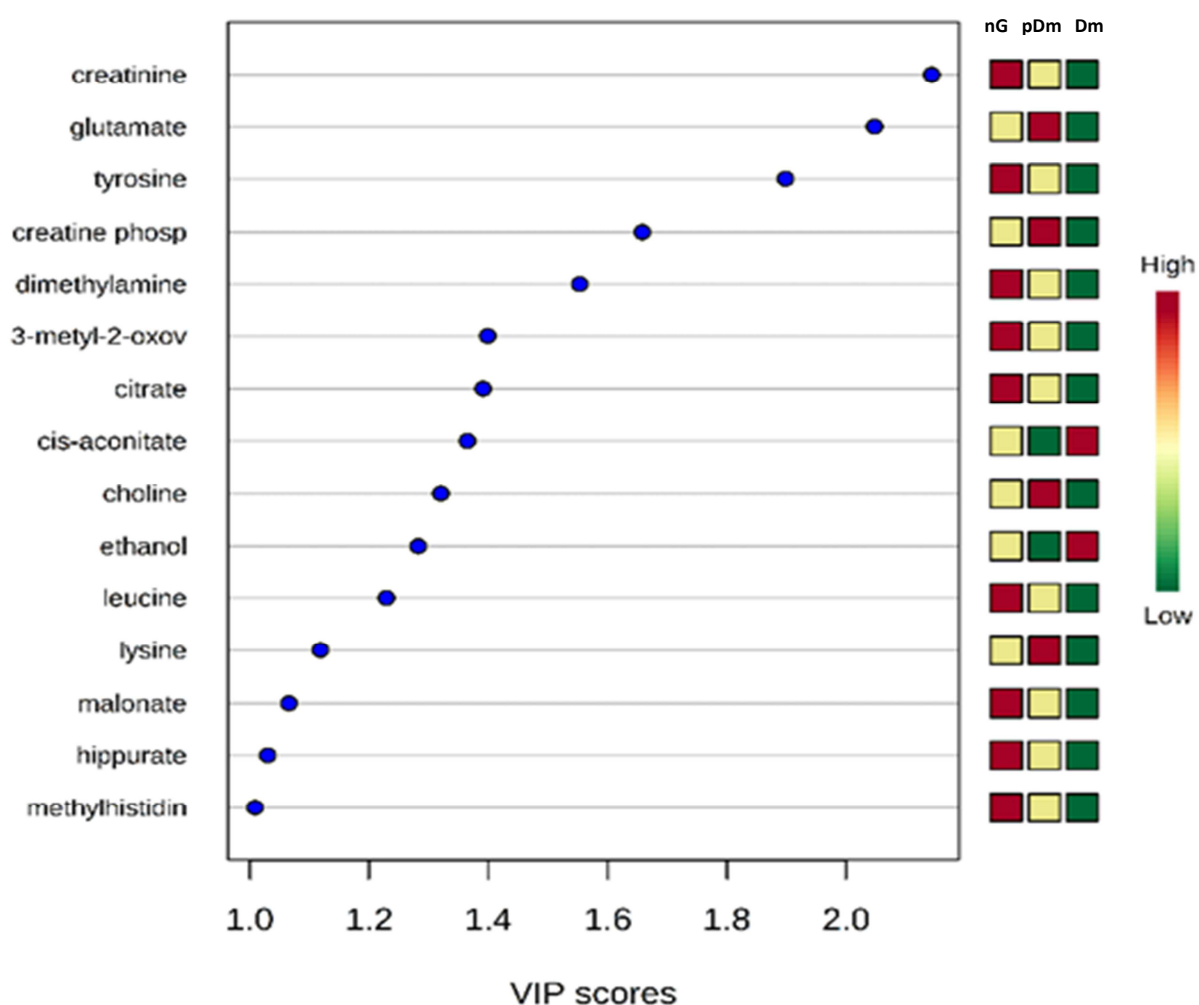


Figura 34: Análisis de los VIP (*Variable Importance Plot*) scores. nG: Normoglicémicos; pDm: Prediabéticos; Dm: Diabéticos.

Como se puede observar, todos los metabolitos se encuentran disminuidos en el grupo Dm, a excepción de cis-aconitato y etanol, los cuales se encuentran

aumentados. Por otro lado, glutamato, creatinfosfato, colina y lisina, se encuentran aumentados en el grupo de pDm con respecto al grupo nG y al grupo Dm.

A partir del análisis de los *VIP scores* se procedió al análisis con *boxplots* de los metabolitos hallados como discriminativos (figura 35). Como ya se ha explicado en el apartado de metodología, el *boxplot* es un método estandarizado para representar gráficamente una serie de datos numéricos a través de sus cuartiles (Q), donde también se representan la mediana y los valores atípicos (*outliers*). En el eje de las y se representa la desviación estándar y en el de las x los grupos comparados.

Si observamos el análisis por los *VIP scores* (figura 34) y el *boxplots* (figura 35) vemos diferencias con respecto al listado de metabolitos obtenidos en el análisis univariado. Así, tanto en el análisis de los *VIP scores* como en el de *boxplots* aparece la metilhistidina como metabolito discriminativo. Esto no ocurre, sin embargo, con la trigonelina, que, pesar de tener significación estadística (metabolito significativo), no se considera discriminativo. Que en un modelo un metabolito sea discriminativo no siempre significa que sea estadísticamente significativo. Si observamos el *boxplot* de la metilhistidina vemos que la mediana del grupo nG y el Dm son suficientemente diferentes y por eso es capaz de separar bien en el modelo que hemos creado a ambas categorías glucémicas, pudiendo afirmarse por ello que se trata de un metabolito discriminativo entre nG y Dm. Sin embargo, puede que la diferencia entre ambas categorías no sea estadísticamente significativa por una excesiva dispersión de los datos, lo que hace que la diferencia de las medias no alcance la significación estadística y se tenga que aceptar la hipótesis nula de que las medias son iguales.

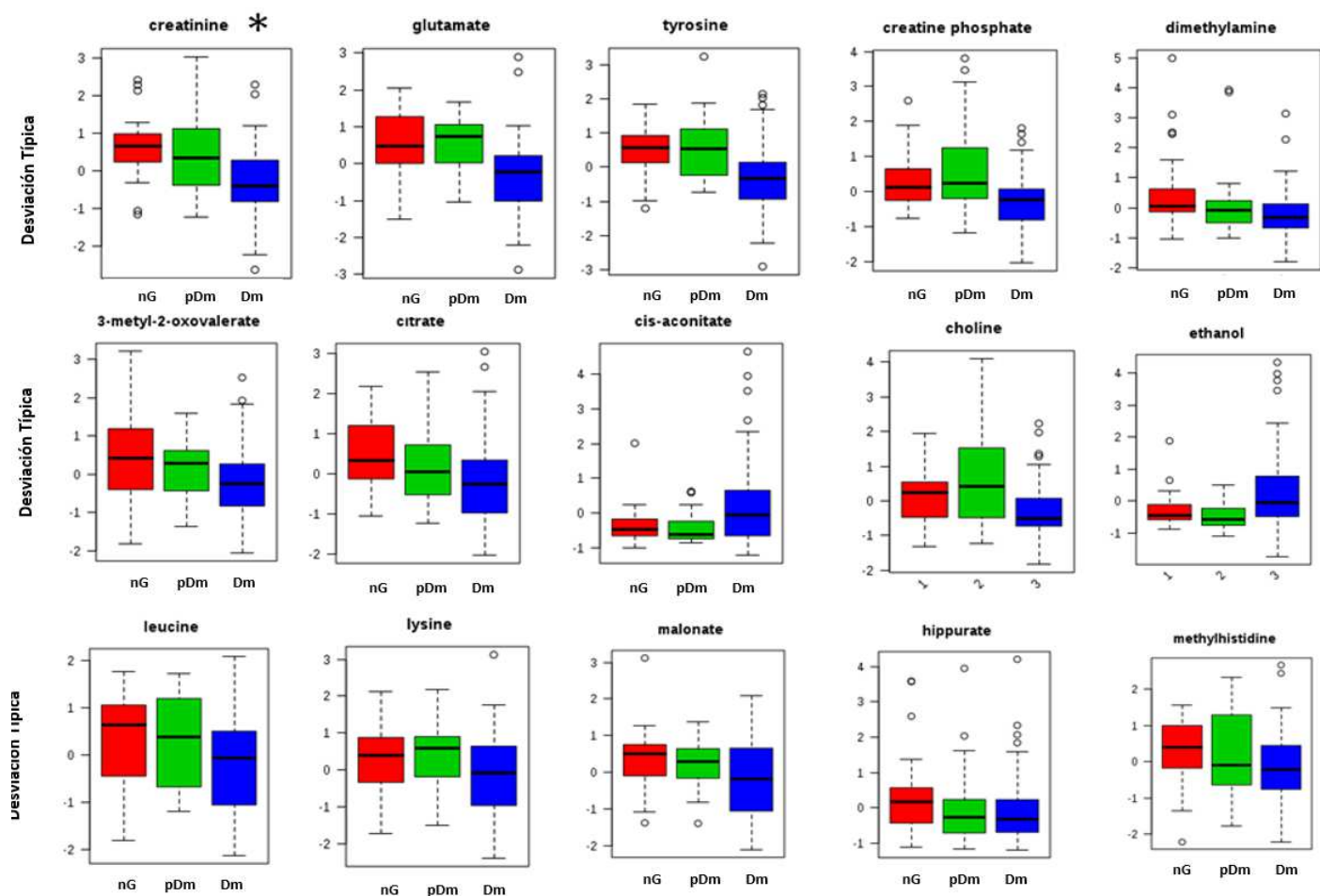


Figura 35: Representación de análisis *boxplot* de los 15 metabolitos que son más discriminantes según grupos de categorías glucémicas (nG: Normoglucémicos; pDm: Prediabéticos; Dm: Diabéticos).

6.2.5. Matriz de confusión para el modelo de clasificación

Se ha realizado una matriz de confusión utilizando todos los datos (resultados del modelo de clasificación) y utilizando sólo los resultados de la validación cruzada (resultados VC) para la validación interna. Los resultados obtenidos se representan en la tabla 11, siendo los más destacables los resultados de la predicción para el grupo Dm y el grupo pDm. Cabe resaltar el elevado valor predictivo para ambos grupos en el modelo de clasificación y en su validación cruzada, de tal forma que para los 87 individuos del grupo Dm el modelo de clasificación predice 74 casos, y la validación cruzada 72. La capacidad predictiva del modelo de clasificación para el grupo pDM es menor, siendo capaz de predecir 21 pero tan solo 10 de los 26 casos por el modelo y tras la validación cruzada respectivamente.

Tabla 11. Matriz de confusión para el modelo de clasificación (C) y para la validación cruzada (CV). FN: falsos negativos. VN: verdaderos negativos. VP: verdaderos positivos. FP: falsos positivos.

RESULTADOS DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN (C)

Matriz de confusión (C)

GRUPO	VP	FP	VN	FN	N
nG	0.63333	0.11504	0.88496	0.36667	30
pDm	0.80769	0.11111	0.88889	0.19231	26
Dm	0.85057	0.05357	0.94643	0.14943	87

Tabla de confusión (C)

	GRUPO REAL		
	nG	pDm	Dm
Predicción como nG	19	4	9
Predicción como pDm	9	21	4
Predicción como Dm	2	1	74

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN CRUZADA (VC)

Matriz de confusión (VC)

GRUPO	VP	FP	VN	FN	N
nG	0.43333	0.19469	0.80531	0.56667	30
pDm	0.38462	0.16239	0.83761	0.61538	26
Dm	0.82759	0.12500	0.87500	0.17241	87

Tabla de confusión (VC)

	GRUPO REAL		
	nG	pDm	Dm
Predicción como nG	13	14	8
Predicción como pDm	12	10	7
Predicción como Dm	5	2	72

6.2.6. Estudio de correlación entre metabolitos

Se ha realizado un análisis de correlación de los 39 metabolitos seleccionados en el análisis de espectros solapados inicial con respecto a ellos mismos mediante la confección de un mapa de calor (*heat maps*) (figura 36), y posteriormente se han relacionado dichos metabolitos entre los diferentes grupos glucémicos mediante la elaboración de otro mapa de calor (*heat maps*) (figura 37).

En el mapa de calor en el que sólo aparecen representados los metabolitos (figura 36), observamos la correlación que existe entre los 39 metabolitos inicialmente considerados. En nuestro caso, se muestran estrechas correlaciones entre grupos que pertenecen a las mismas rutas metabólicas, como es el caso de los cuerpos cetónicos (acetona, acetoacetona y 3-hidroxibutirato) a metabolitos que pertenecen a la misma clasificación (como los aminoácidos prolina y N6-acetil-lisina). También nos muestra la poca correlación que pueden presentar metabolitos de vías metabólicas no relacionadas, como es el caso de los cuerpos cetónicos con la urea y la xantosina. Estos son algunos de los ejemplos que podemos encontrar.

6. Resultados

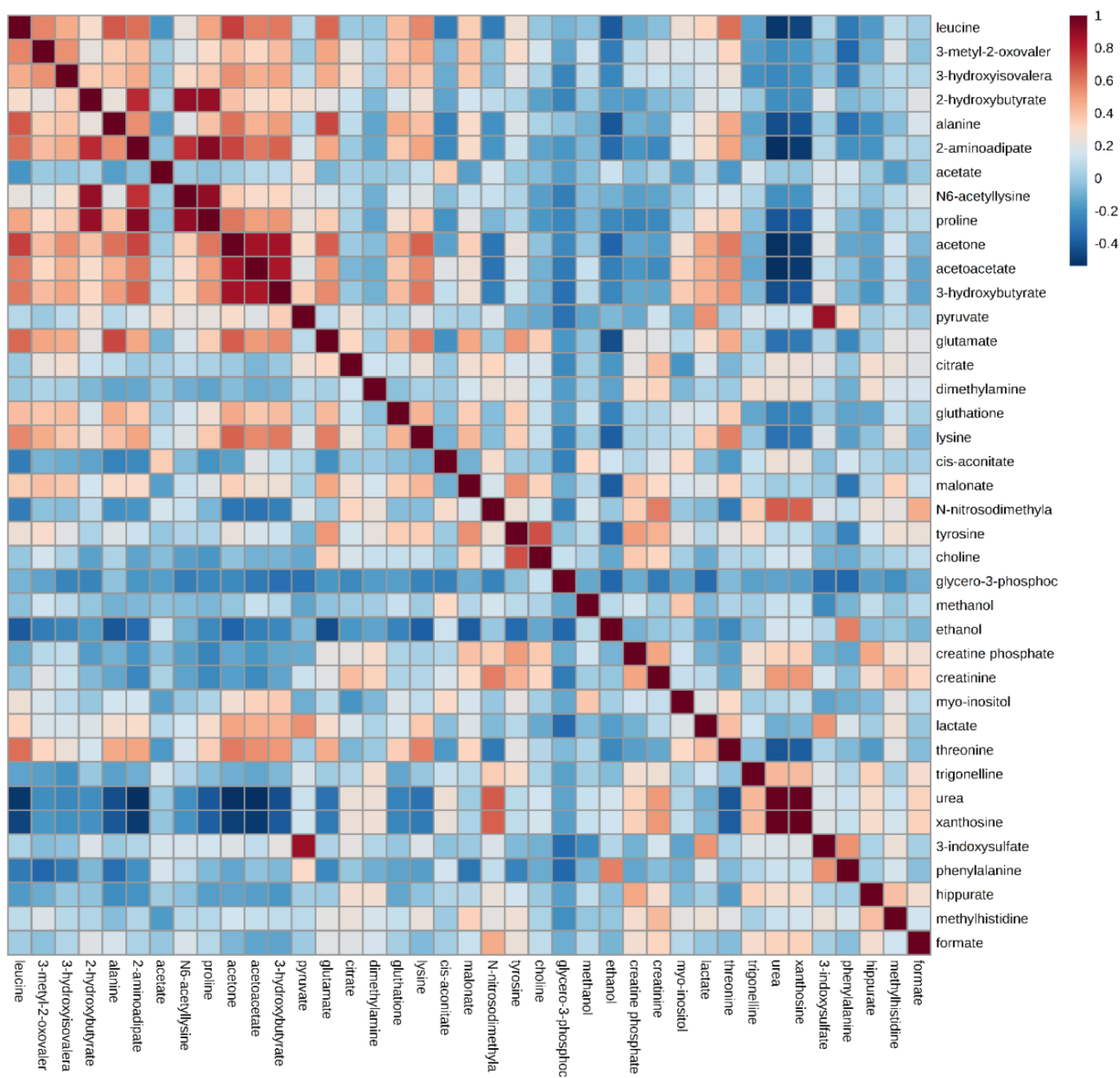


Figura 36: Análisis de correlación entre los 39 metabolitos mediante mapa de calor.

En la figura 37, se representan todos los datos obtenidos en celdas de color, que corresponden a un valor de unidades arbitrarias en su tabla de datos, con las muestras de cada uno de los grupos glucémicos en las columnas, y los metabolitos obtenidos, en filas. La escala de color de rojo intenso a azul intenso, indica si la correlación es positiva o negativa, respetivamente, así como su intensidad según la intensidad del tono de color. El mapa de calor nos permite identificar metabolitos que son diferentes en cada situación o subgrupos de una muestra, en nuestro caso normoglucemia (nG), prediabetes (pDm) y diabetes (Dm).

Las agrupaciones obtenidas entre las categorías de pacientes aparecen expresadas en forma de diagramas de árbol. Lo ideal hubiera sido que hubiera tres ramas que separara las tres categorías glucémicas, sin embargo, en muestras humanas esto rara vez sucede porque la dispersión interindividual suele ser muy grande y se necesita un tamaño muestral elevado para evitar esa dispersión. En la parte de la derecha del mapa se representan, también mediante un diagrama en árbol, las agrupaciones entre los metabolitos del estudio, muchas veces porque comparten ruta o se relacionan con rutas similares.

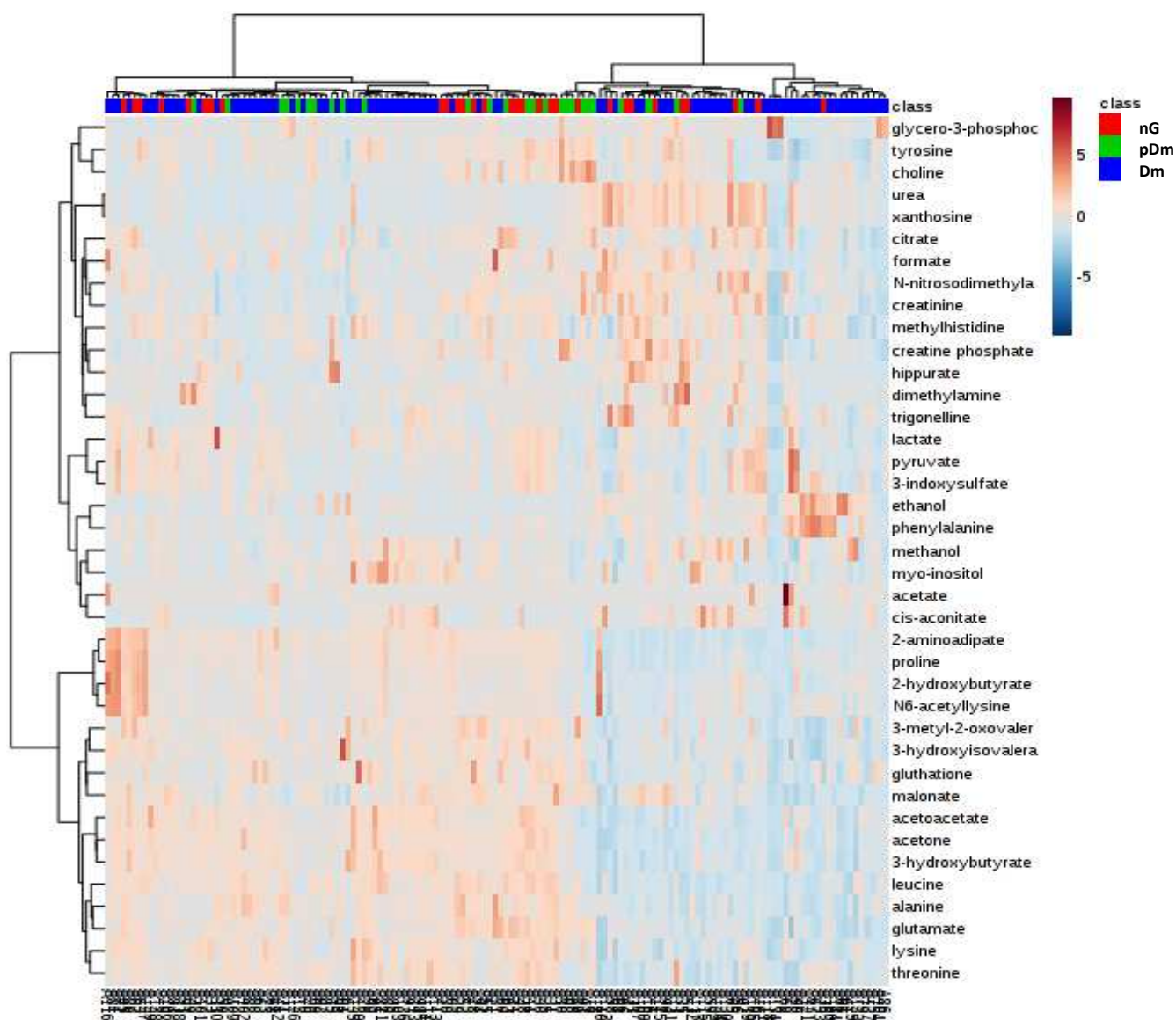


Figura 37: Mapa de calor original para cada individuo. En la parte superior tenemos representados todos los individuos marcados con un color en función del grupo al que pertenecen (rojo = normoglucémicos (nG); verde = prediabéticos (pDm) y azul = diabéticos (Dm)).

La figura 38 representa de forma más visual y simplificada los resultados de la figura anterior. Las escalas de color se interpretan de igual forma que en la figura 37. Se observa que, en general, los metabolitos se encuentran en mayor proporción en sujetos del grupo nG y en menor proporción en el grupo Dm, aunque con excepciones en algunos metabolitos. Los metabolitos en los que podemos observar una variación

en la proporción de mayor a menor, desde el grupo normoglucémico, pasando por los prediabéticos y diabéticos son: 3-m-2-oxovalerato, citrato, dimetilamina, malonato, N-nitrosodimetilamina, creatinina, trigonelina, urea, xantosina, 3-indoxisulfato, hipurato, m-histidina y formato. Por otro lado, el único metabolito que se encuentra de menor a mayor proporción desde el grupo normoglucémico, pasando por los prediabéticos y llegando a los diabéticos, es el mioinositol.

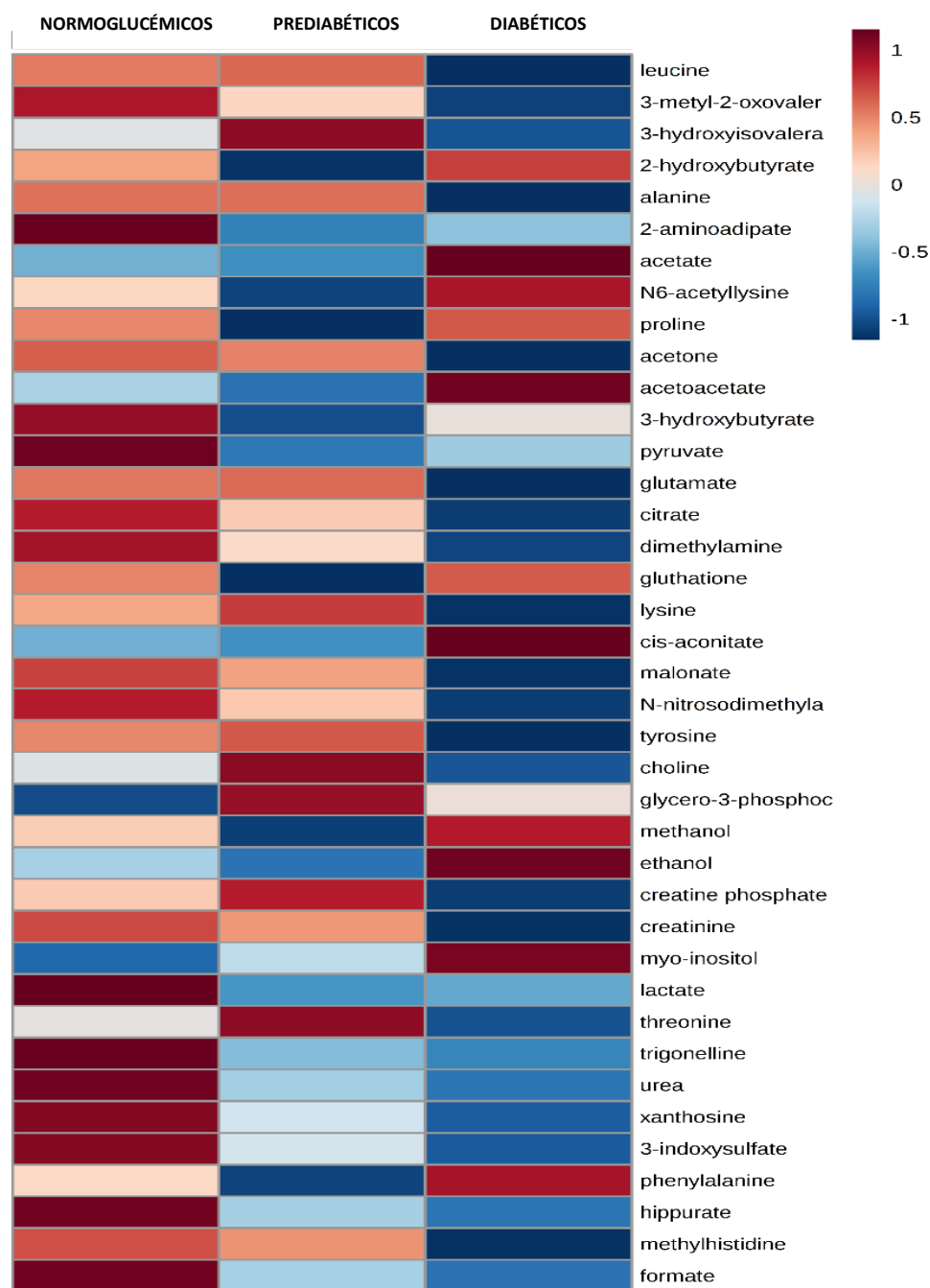
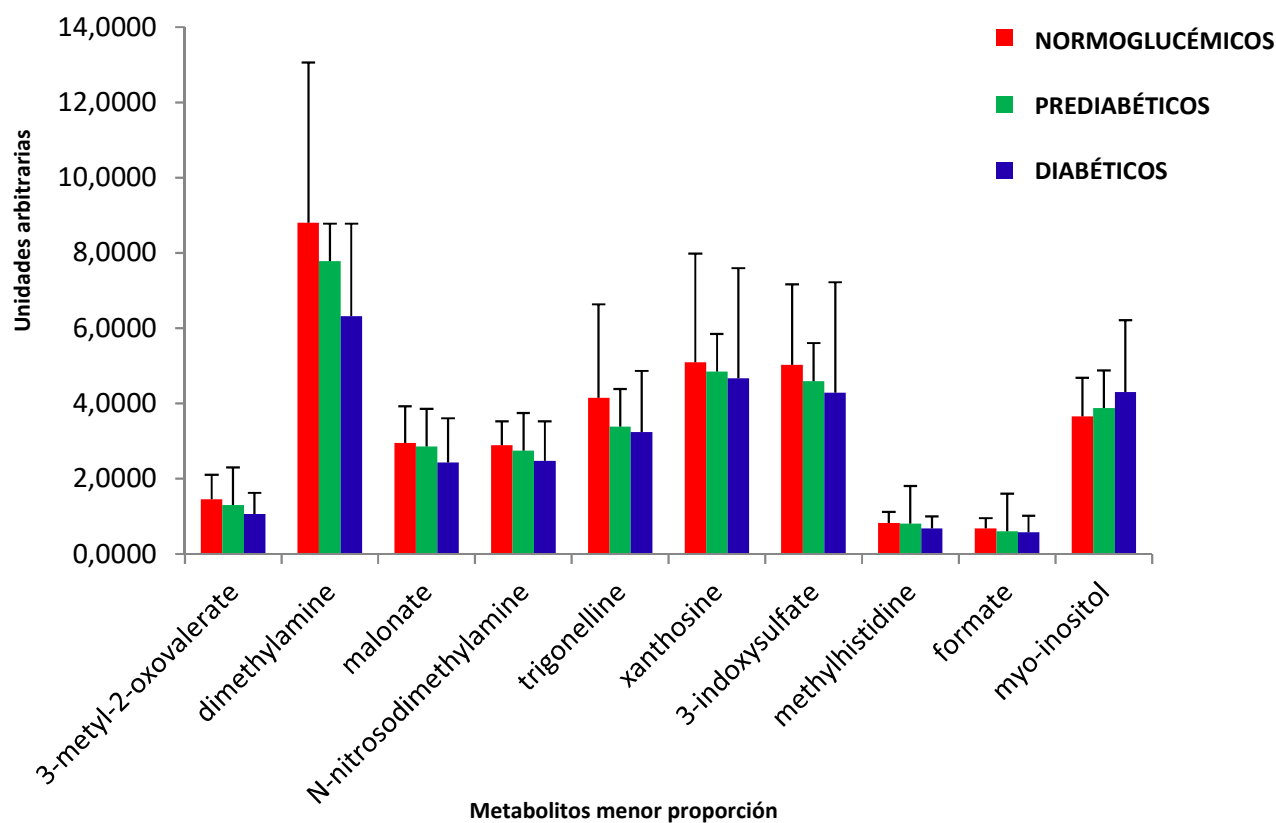


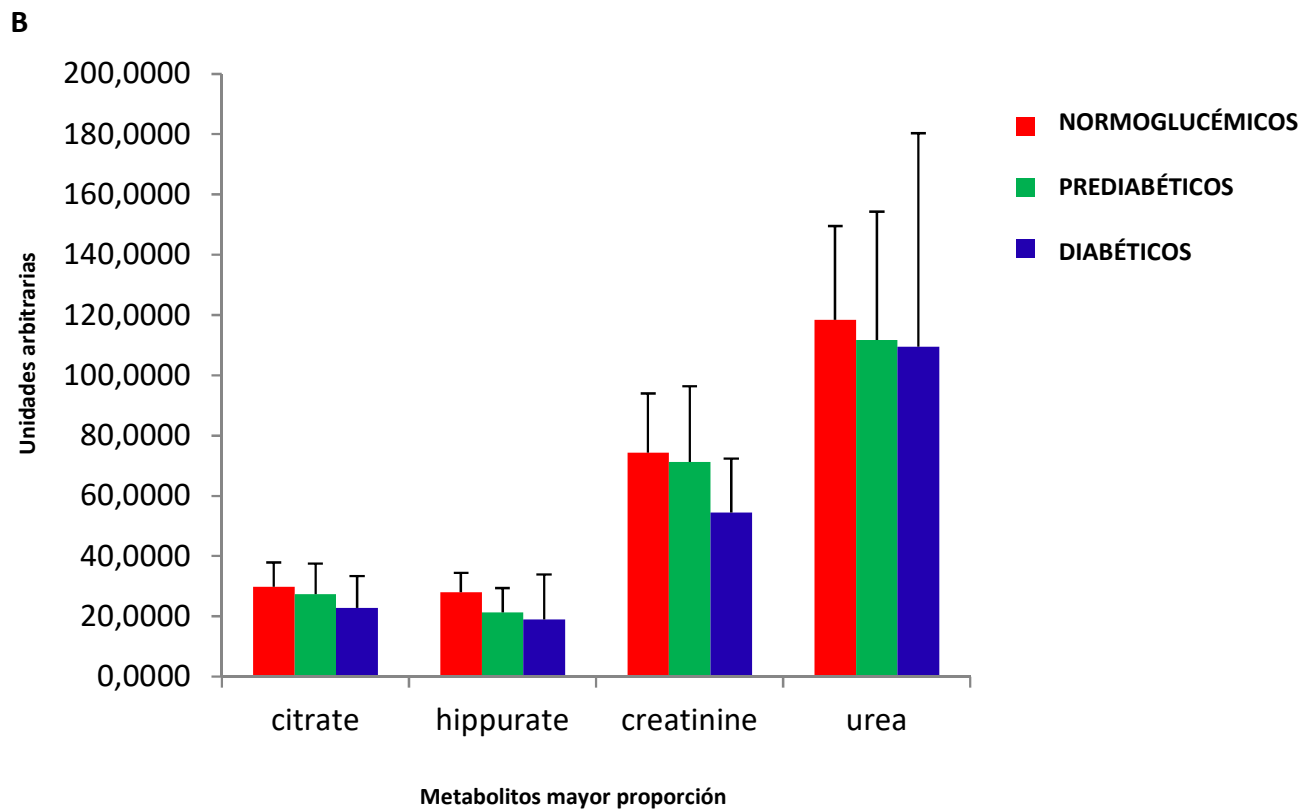
Figura 38: Representación simplificada del mapa de calor por categorías glucémicas.

6. Resultados

Las figuras 39A y 39B muestran las gráficas con las medias y desviaciones típicas de las unidades arbitrarias de los metabolitos seleccionados en el paso anterior según el grupo glucémico. Se utilizan dos gráficos para separar los metabolitos en función de las proporciones existentes entre los mismos. En el gráfico 39A se representan los metabolitos de menor proporción, mientras que en el gráfico 39B se representan los metabolitos con mayor proporción. Se aprecia cómo hay un descenso en la proporción de estos metabolitos cuando pasamos de pacientes normoglucémicos, a aquellos con una prediabetes y, finalmente, a pacientes con diabetes, a excepción del mioinositol, con un comportamiento inverso.

A





Figuras 39A y 39B: Concentraciones de metabolitos (media y desviación típica) de los metabolitos seleccionados en el mapa de calor en función del grupo glucémico.

7. DISCUSIÓN

Como hemos podido observar en el apartado de resultados, de los espectros obtenidos por H-NMR se ha conseguido identificar 39 regiones de metabolitos, de los cuales se seleccionaron los 15 (leucina, 3-metil-oxoalerato, glutamato, citrato, dimetilamina, lisina, cis-acnitato, malonato, tirosina, colina, etanol, creatinfosfato, creatinina, trigonelina e hipurato) que en el análisis univariado mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo Dm con respecto a los grupos pDm y nG.

Como se observa en la tabla 10 del apartado de resultados, cuando consideramos el grupo metabólico al que pertenecen los 15 metabolitos con mayores diferencias al comparar los sujetos diabéticos respecto de los no diabéticos (normoglucémicos más prediabéticos) se comprueba que los metabolitos identificados pertenecen en su mayoría al grupo de los aminoácidos, seguido del de los ácidos orgánicos y los organonitrogenados, observándose además que la mayoría se encuentran disminuidos significativamente en el grupo Dm respecto a los otros dos grupos poblacionales, a excepción de los metabolitos cis-acnitato y etanol, los cuales se encuentran aumentados en Dm respecto de los no diabéticos (nG+pDm). Por otra parte, glutamato, creatinfosfato, colina y lisina, se encontraron aumentados significativamente en pDm con respecto a nG y Dm.

Ya en el análisis multivariado hay que reseñar que la trigonelina, que sí encontró diferencias estadísticamente significativas entre categorías glucémicas en el análisis univariado, desaparece como metabolito discriminativo tras estimar los *VIP scores* y el *Boxplot*, por lo que no se consideró en posteriores análisis de metabolitos candidatos. De modo inverso, la metilhistidina, en el modelo multivariado, aparece como metabolito discriminativo pese a que no se obtuvieran diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariado, y por eso se consideró como un metabolito candidato más a considerar tras el análisis de los *VIP scores* y *Boxplot*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los mapas de calor muestran una tendencia en algunos de los metabolitos, lo cual es interesante para poder definir la evolución de la patología en función de la proporción de metabolitos obtenidos. Así, de los 13 metabolitos que se ha hallado producen tendencia mediante esta técnica analítica: 3-m-2-oxoalerato, dimetilamina, malonato, trigonelina, m-

histidina, hipurato, citrato, creatinina, N-nitrosodimetilamina, xantosina, 3-indoxisulfato, formato, urea y mioinositol, los seis últimos no parecían relevantes en análisis anteriores, por lo que sería interesante ver qué posible relación tienen con la patología diabética.

Serán pues un total de 22 metabolitos los que finalmente se han considerado como potenciales marcadores metabolómicos y que serán objeto de esta discusión, en la que se revisarán los metabolitos primero según grupos bioquímicos para en una segunda parte hacer una exposición de metabolitos según las categorías consideradas en el continuo disglucémico del presente trabajo.

7.1. Metabolitos implicados en la diferenciación de los grupos glucémicos según su naturaleza bioquímica.

7.1.1. Metabolismo de los aminoácidos (AA)

AA y α -cetoácidos de cadena ramificada: Leucina y 3-metil-2-Oxovalerato

La leucina (Leu) se clasifica dentro de los aa ramificados (AAR) y a su vez, como un aa alifático no polar esencial. Los AAR son aminoácidos esenciales cuya estructura de carbono está marcada por un punto de ramificación. Son fundamentales para la vida humana y están particularmente involucrados en el estrés (catabolismo observado en condiciones como sepsis, politraumatismo...), la producción de energía (degradación en metabolitos del ciclo de Krebs, gluconeogénesis y cetogénesis) y el metabolismo muscular (síntesis proteica). A pesar de sus similitudes estructurales, los AAR participan en diferentes rutas metabólicas, en concreto, la Leu únicamente en el metabolismo lipídico, siendo el único AAR exclusivamente cetogénico, al catabolizarse en acetoacetato y acetil-CoA, mientras que Valina e Isoleucina son de orientación gluconeogénica y mixta, respectivamente. De especial interés en el tema central del trabajo actual, la Leu estimula la liberación de insulina, que a su vez estimula la síntesis de proteínas e inhibe su degradación (49).

El 3-metil-2-oxovalerato es el α -cetoácido de cadena ramificada derivado de la Isoleucina. Los α -cetoácidos son los metabolitos que se generan como consecuencia del primer paso del catabolismo de los AAR, reacción que se realiza a través de una transaminación mediada por la transaminasa-2 de AAR muscular

(BCAT2). Posteriormente, los α -cetoácidos se metabolizan mediante el complejo deshidrogenasa de aminoácidos ramificados (BCKDH) hacia sus productos finales, cetogénicos y glucogénicos (92).

AA polares con carga: Lisina y Ácido glutámico/Glutamato

La lisina (Lys) es un aa alifático polar (con ión positivo) esencial. Su déficit se relaciona con inmunodeficiencia. Se han encontrado niveles bajos de Lys en pacientes con enfermedad renal, aunque el significado de estos niveles no está claro. Probablemente los requerimientos de Lys se ven aumentados en situaciones de estrés (49).

El glutamato o ácido glutámico (Glu) se clasifica como aa alifático polar (con ión negativo) no esencial. Participa en diferentes rutas metabólicas como precursor (ciclo de Krebs, ciclo de la urea, gluconeogénesis...), pero además es uno de los neurotransmisores de rápida excitación más abundantes del sistema nervioso en mamíferos (49).

AA aromáticos: Tirosina

La tirosina (Tyr) se clasifica como aa aromático no esencial ya que se puede sintetizar a partir del aa aromático esencial fenilalanina. Además, es la precursora de las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), neurotransmisores del sistema nervioso simpático. También es precursora de hormonas tiroideas, catecolestrógenos y melanina. Añadir que también es un importante aa en muchas proteínas y péptidos, además de encefalinas (49).

7.1.2. Organonitrogenados: Colina, Dimetilamina y metil-Histidina

La colina es el componente básico de la lecitina que se encuentra en muchas plantas y órganos animales. Es importante como precursor de la acetilcolina, como donante de metilo en varios procesos metabólicos y en el metabolismo de los lípidos. Los humanos pueden sintetizar pequeñas cantidades (al convertir la fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina (PC)) aunque se debe consumir en la dieta (49).

La dimetilamina, que pertenece a la misma ruta metabólica que la colina, es una amina secundaria orgánica presente en la orina y que normalmente se encuentra elevada tras el consumo de marisco, pescado y alimentos ricos en colina. Las principales fuentes de dimetilamina urinaria incluyen la N-óxido de trimetilamina (procedente de la colina) y la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la síntesis de óxido nítrico (49,93).

La metilhistidina pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como histidina y derivados. Hay, principalmente, dos tipos de metilhistidina, la 1m-histidina y la 3m-histidina. La 1m-histidina no se sintetiza en humanos y la obtenemos a partir de la ingesta de carne, por lo que representa un buen marcador de la dieta (94). La 3m-histidina se forma a partir de la metilación postraducciona de los residuos de histidina de las proteínas de actina y miosina (49,94). La 3m-histidina es liberada durante el catabolismo proteico, pero no se puede reutilizar; por lo tanto, la concentración plasmática y la excreción urinaria de 3m-histidina son marcadores sensibles de actina y miosina, y se estima que aproximadamente el 75% de la 3m-histidina se origina en el músculo esquelético, por lo que proporciona un índice de la tasa de degradación de las proteínas musculares (49,94), como también se observa en el reciente estudio de *Koshikawa et al.* (95).

Además, la degradación intestinal de proteínas y la ingesta de carne también modifican los niveles de 3m-histidina (94). Con respecto a los seres humanos, la 3m-histidina, está asociada a varias enfermedades tales como DM2, esofagitis eosinofílica y enfermedad renal; también se ha relacionado con el trastorno metabólico innato conocido como acidemia propiónica.

7.1.3. Metabolismo energético: Creatinfosfato y Creatinina

El creatinfosfato (CrP) es el metabolito que se obtiene a partir de la fosforilación de la creatina a través de la reacción mediada por la creatinkinasa. Juega un papel básico en la producción de energía en el tejido muscular estriado de cara a la contracción del mismo, mediante la fosforilación del ADP a ATP. A su vez, la deshidratación y desfosforilación del CrP genera creatinina como producto de degradación. La creatinina se produce de manera constante, principalmente en el músculo, pasando al plasma desde donde es eliminada a través de la filtración

glomerular y excretada parcialmente a nivel tubular (49). La medida de la creatinina en suero se utiliza de forma estandarizada como indicador de la función renal (49,71).

7.1.4. Metabolismo de los ácidos orgánicos

Intermediarios del ciclo de Krebs: Citrato y cis-Aconitato

El citrato es un ácido orgánico intermediario del ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos, también llamado ciclo del ácido cítrico por ser, dicho ácido, punto de partida del ciclo. Se obtiene a partir de acetil-coA y oxalacetato, y continúa su metabolismo hacia la producción de D-isocitrato mediante la doble acción de la aconitasa, obteniéndose un metabolito intermedio que es el cis-aconitato.

Malonato

El malonato o ácido malónico pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como ácidos dicarboxílicos y derivados. En los humanos, el malonato participa en una serie de reacciones enzimáticas, en particular, el malonato y el acetato se pueden convertir en acetoacetato, reacción mediada por el enzima ácido graso sintasa, que también sintetiza malonato y coenzima A (coA) a partir de malonil-CoA, por lo tanto, el malonato está implicado en la síntesis de ácidos grasos (49).

Hipurato

El hipurato o ácido hipúrico es un ácido orgánico que se obtiene mediante la unión del ácido benzoico con el aa glicina, por lo que también es una acilglicina. Es un componente normal de la orina y, aunque no existe ningún beneficio para la salud bien documentado asociado a él, salvo que se puede ver elevada su concentración con el consumo de compuestos fenólicos (49), puede aparecer en humanos como un producto excretor de fuentes naturales o no naturales (96).

7.1.5. Alcoholes y alcaloides: Etanol y Trigonelina

El etanol no se sintetiza en el cuerpo humano pero sí es metabolizado, por la alcohol deshidrogenasa, en acetaldehído (producto más tóxico que el etanol) y este a su vez es metabolizado por la aldehído deshidrogenasa en ácido acético, el cual se va a convertir en acetil-CoA, un intermediario metabólico clave tanto en el catabolismo para la producción de energía (ciclo de Krebs, β -oxidación, fosforilación oxidativa), como en el anabolismo para la biosíntesis de glucosa, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, aminoácidos y neurotransmisores (49).

La trigonelina pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocido como alcaloides y derivados. Se encuentra en mayor concentración en algunos alimentos como el café, el guisante, las semillas de fenogreco y de cáñamo; además, es un producto del metabolismo de la niacina (vitamina B3) que se excreta en la orina (49). En la medicina tradicional china se ha utilizado el fenogreco como tratamiento de la DM, el cual, como hemos visto, posee como principal alcaloide la trigonelina (40,97).

7.1.6. Otros

El primer metabolito de este último grupo es la N-nitrosodimetilamina (NDMA). Su exposición debe a una amplia variedad de fuentes, entre las cuales se encuentran las fuentes ambientales, de consumo y ocupacionales, además también puede formarse en el estómago durante la digestión de alimentos que contienen alquilaminas. En el hígado, la NDMA se degrada en otras sustancias, la mayoría de las cuales abandonan el cuerpo en un período de 24 horas a través del aire que se exhala de los pulmones y de la orina, junto con la NDMA que no se ha degradado (98).

El indoxisulfato es un metabolito que pertenece al metabolismo del triptófano y de la tirosina, encontrándose en condiciones normales en plasma y orina. Se ha identificado como toxina urémica, provocando la aceleración de la esclerosis glomerular y la fibrosis intersticial, incrementando la tasa de progresión del fallo renal (49,99).

El formato está involucrado tanto en la producción de acidosis metabólica como en la interrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial mediante la inhibición de la actividad de la citocromo oxidasa (49).

El mioinositol es una isoforma del inositol (ciclohexano con seis grupos hidroxilo) y es la más común en la naturaleza. Se encuentra en alimentos, como cereales con elevado contenido en salvado (49). El ser humano lo sintetiza, principalmente en el riñón, a partir de glucosa, vía glucosa-6-fosfato y actúa como precursor de mensajeros secundarios como los inositoles fosfatos, además de formar parte de los fosfatidilinositoles (49,100). También se utiliza como tratamiento para el síndrome de ovario poliquístico porque actúa aumentando la sensibilidad a la insulina, lo que ayuda a mejorar la función ovárica y reduce el hiperandrogenismo (49).

La xantosina, también conocida como ribosido de xantina, pertenece a los compuestos orgánicos conocidos como nucleósidos de purina y en los humanos, participa en diversas reacciones enzimáticas relacionadas, principalmente, con el metabolismo de las purinas (49).

El último metabolito que presenta una tendencia en nuestros grupos de pacientes es la urea. Como es sabido, la urea es uno de los principales componentes de la orina que se sintetiza a partir de la degradación de proteínas, de acetil-CoA y aminoácidos, en el ciclo de la urea.

7.2. Metabolitos implicados en la diferenciación de los grupos glucémicos según categorías glucémicas.

En base a los metabolitos que aparecen alterados en el grupo Dm de nuestro estudio, podríamos destacar varios entornos metabólicos que veríamos afectados.

En primer lugar, la mayoría de los aminoácidos y derivados que hemos hallado relacionados con la DM poseen una orientación cetogénica, algunos exclusiva como leucina y lisina y otros mixta como tirosina y 3-metil-2-oxovalerato, que se muestran disminuidos en el grupo de Dm. Ello estaría expresando una tendencia a la síntesis de cuerpos cetónicos respecto de los no diabéticos, con la consiguiente disminución de sus precursores (figura 40).

7. Discusión

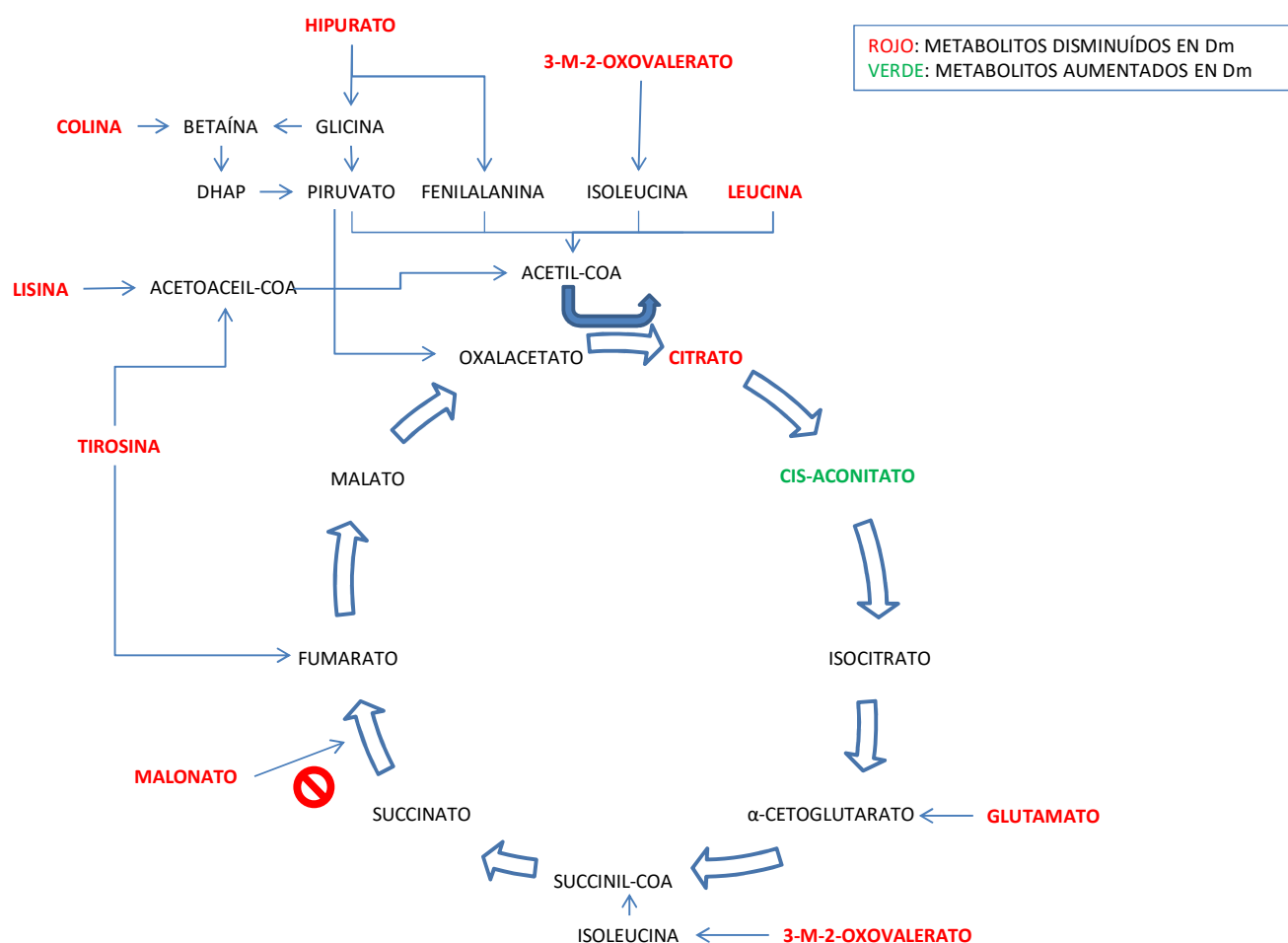


Figura 40: Ciclo de Krebs y sus metabolitos intermediarios. En esta figura se representan 9 de los 14 metabolitos más significativos de nuestro estudio y en qué punto del ciclo de Krebs se ven implicados. En color rojo se señalan los metabolitos que están disminuidos significativamente en el grupo Dm respecto del grupo de no diabéticos (nG+pDm). En verde se señalan los metabolitos que se encuentran significativamente elevado en el grupo DM respecto del grupo de no diabéticos (nG+pDm).

En segundo lugar, se observa un compromiso en el estatus energético muscular representado por unos valores disminuidos de creatinfosfato que estaría relacionado con alteraciones en los sistemas básicos de producción de energía como el ciclo de Krebs, el cual se encontraría acelerado. Ello provocaría en un extremo del ciclo una elevación de cis-aconitato y en la parte opuesta una

disminución en el efecto bloqueante sobre el ciclo debido a la disminución de los niveles de malonato, que es un inhibidor efectivo de la succinato deshidrogenasa que transforma el succinato en fumarato (figura 40). Es cierto que se observa una disminución en los niveles de citrato urinario, pero ello puede ser justificado por un aumento de su reabsorción renal.

El tercer grupo metabólico afectado es el de la colina y su derivado, la dimetilamina, en el que se observa también una disminución en Dm (figura 41).

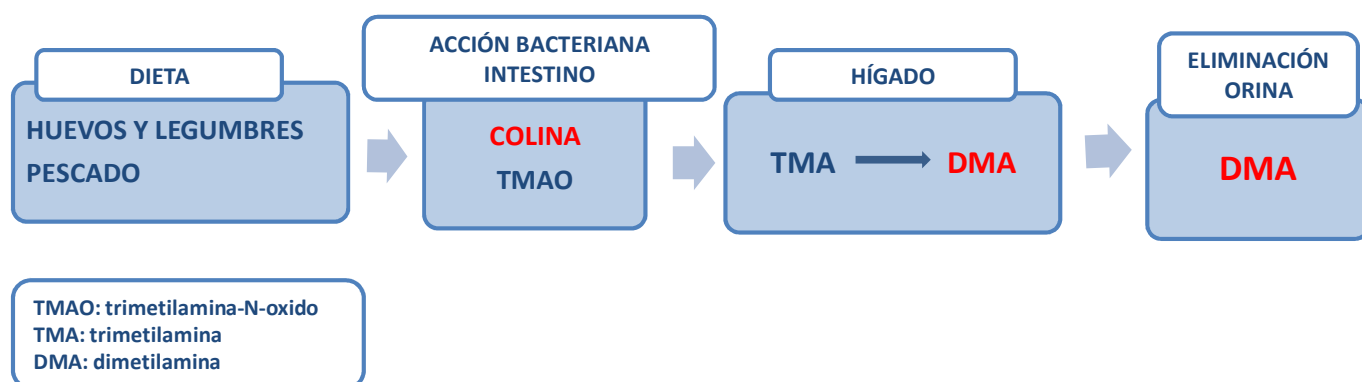


Figura 41: Ruta de degradación de colina y eliminación de dimetilamina (DMA). En rojo se señalan los metabolitos que se encuentran disminuidos de forma significativa en el grupo DM respecto al grupo de no diabéticos (nG+pDm).

En resumen, de los metabolitos que nos permiten diferenciar el grupo Dm de los otros dos (pDM y nG) se encuentran disminuidos en el grupo Dm: leucina, lisina, 3-m-2-oxovalerato, tirosina, glutamato, m-histidina, hipurato, colina, dimetilamina, creatinfosfato, creatinina, citrato, malonato y trigonelina; y se encuentran aumentados en el grupo Dm: cis-acnitato y etanol. Además, la colina nos permite establecer diferencias significativas entre los tres grupos de manera que el grupo pDM se diferencia también del grupo nG.

Son múltiples los trabajos en los que encontramos involucrados estos metabolitos en la línea de nuestro estudio, como los que relacionan el papel de los AAR y AAAR en individuos que presentan resistencia a la insulina, obesidad y DM2, además de estar relacionados con la predicción de progresión hacia DM2 (54,71-75,101) y enfermedad coronaria (81).

En nuestro estudio la leucina se encuentra disminuida en el grupo Dm con respecto a los nG y pDm, disminución que también se observa, en los niveles séricos de AAR, en los trabajos de *Del Coco et al.* (102), en el cual también se observa una disminución de lisina, tirosina, glutamato y citrato en suero, y de *Shin et al.* (103), destacando el primero una mayor reducción en estados diabéticos avanzados y demostrando, el segundo, que la alteración en la señalización de la insulina hipotalámica puede disminuir los niveles plasmáticos de AAR al inducir la actividad hepática de la α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH), una enzima limitante de la velocidad en la vía de degradación de AAR.

En el trabajo de *Liu et al.*, se describe una disminución de los AAR en plasma (81) en línea con nuestro estudio en orina, en el que los niveles del 3-metil-2-oxovalerato se encuentran disminuidos de forma estadísticamente significativa en las muestras de orina del grupo Dm, con un patrón similar al seguido por la leucina, por lo que la misma argumentación detallada para dicho AAR acerca de la actividad de la BCKDH podría explicar la disminución de este metabolito, ya que tanto AAR como α -cetoácidos son previos a la acción de la deshidrogenasa citada.

Las alteraciones tempranas en los AAR se han relacionado con el riesgo de desarrollo de DM2, pero las complejas alteraciones metabólicas subyacentes a la fisiopatología de la DM2 siguen en proceso de esclarecimiento (104), pudiendo, además, contribuir la disminución de la leucina a la decreciente capacidad de síntesis de insulina que se observa en la progresión de la DM2.

El hecho de que sólo se vean afectadas las líneas de la leucina e isoleucina y no la de la valina, dentro de los AAR, podría indicar un consumo incrementado de estos dos aminoácidos debido a una mayor tendencia metabólica en la DM2 hacia la cetogénesis y lipogénesis respecto a la gluconeogénesis, ya que la leucina es solo cetogénica, la isoleucina mixta y solo la valina es exclusivamente glucogénica, como se especificó con anterioridad. Sin embargo, como ocurre también con los AAR, estudios muestran disminuciones significativas de tirosina (AAAr) en pacientes con DM2 (81,102,105).

En el estudio realizado por el grupo de *Ottosson et al.* obtuvieron valores disminuidos de lisina en muestras de plasma de pacientes con DM2 y ECV con respecto al grupo normoglucémico (106). En nuestro estudio los valores de lisina se

encuentran disminuidos de forma significativa en las muestras de orina del grupo Dm respecto al de los grupos pDm y nG. Por otro lado, la lisina es también un aminoácido cetogénico y, en el mismo sentido que lo que les ocurre a los AAR, sus niveles podrían disminuir de cara a un incremento en la producción de acetoacetato (figura 40).

Aunque hay poca evidencia que la lisina esté involucrada en el desarrollo de DM2, el grupo de *Bao et al.* también detectaron niveles disminuidos en DM2, respecto al grupo normoglucémico, niveles que se recuperaron tras el tratamiento con el fármaco insulinosensibilizador rosiglitazona (107).

Por otro lado, el grupo de *Yoursi et al.* consiguieron medir 2178 metabolitos en saliva, sangre y orina de 188 individuos con DM2 y 181 normoglucémicos. Mediante un análisis multivariado de regresión lineal identificaron metabolitos asociados con diabetes y posibles marcadores de enfermedad aguda y control glucémico a corto y largo plazo. En el grupo DM2 observaron una disminución estadísticamente significativa de glutamato y m-histidina en orina, entre otros metabolitos, con respecto al grupo normoglucémico (108).

Este resultado apoya el obtenido en nuestro estudio donde, pese a que las diferencias no fueron significativas en m-histidina, sí que es un marcador con tendencia a disminuir según nuestro VIP scores del modelo PLS-DA. Los mecanismos por los que se produce una disminución de m-histidina en DM2 se desconocen, pero si su producción tiene que ver con la masa muscular y el catabolismo proteico, puede que estos pacientes tengan una menor masa muscular, ya que el rango de edad en el grupo Dm es superior al de los otros dos grupos en nuestro estudio. Aunque, en cualquier caso, no hay que perder de vista que las diferencias observadas para la m-histidina no fueron estadísticamente significativas.

Shao et al. evaluaron potenciales biomarcadores para valorar la presencia de nefropatía diabética en pacientes DM2 y observaron niveles de glutamato en orina significativamente inferiores en el grupo de pacientes DM2 con nefropatía diabética con respecto a los pacientes DM2 sin nefropatía diabética (100), lo que relaciona su disminución con la progresión de la diabetes.

Los resultados de los estudios que evalúan la evolución del glutamato en orina, apoyan nuestros resultados en los que se observa una disminución significativa del grupo de Dm respecto al resto de categorías glucémicas.

La colina es otro de los metabolitos de nuestro estudio que se encuentra disminuido significativamente en el grupo con Dm. Cabe destacar que la colina se encuentra significativamente aumentada en el grupo de pDm con respecto del grupo de nG. Teniendo en cuenta que uno de los principales destinos de la colina es la síntesis de acetilcolina (49), la producción de este neurotransmisor por las células alfa del páncreas parece estimular la liberación de insulina en las células beta (109,110) (figura 42), aunque esta acción colinérgica parece involucrar otros procesos moduladores del control de la secreción de insulina por el páncreas (111), parece clara la influencia paracrina de la acetilcolina con respecto a la liberación de insulina. El hecho de que la colina, como precursor de acetilcolina, se encuentre significativamente elevado en pDm y dado que no parece lógico que el aporte externo de colina en dicho grupo pueda diferir del de los otros dos grupos estudiados, un aumento de la síntesis hepática de colina en pDm podría estar detrás de dicho incremento. Aunque quedaría por relacionar dicho aumento con una mayor producción de acetilcolina por células alfa pancreáticas, se plantea la hipótesis de que la necesidad de un incremento en la secreción de insulina este detrás del incremento de producción endógena de colina en pDm. Además, dado que la actividad colinérgica retarda los síntomas de la neuropatía, si el aumento de colina en pDm potencia la síntesis de acetilcolina también a nivel sistémico, ello puede contribuir al hecho de que la neuropatía diabética (alteración microvascular) no aparezca hasta que comienza el estado diabético propiamente dicho, en el que la colina disminuye (112). Estos datos refuerzan la hipótesis planteada por la que la colina, como precursor de la acetilcolina, esté elevada solo en el grupo de pDm. En otros grupos de investigación, la colina aparece como forma de fosfatidilcolinas (PC) cuando se relaciona con DM. Los resultados obtenidos difieren según la PC, ya que en el grupo de *Floegel et al.* la lysoPC y las acilalquilPC se encuentran significativamente disminuidas en las muestras de suero del grupo con DM2 (113). El grupo de *Shi et al.* observó que las PC que contenían ácidos grasos de cadena impar disminuyeron en las muestras de plasma durante el seguimiento del grupo

DM2. Las alteraciones tempranas en los fosfolípidos se han relacionado con el riesgo de DM2, pero las complejas alteraciones metabólicas subyacentes a la fisiopatología siguen sin estar claras (104).

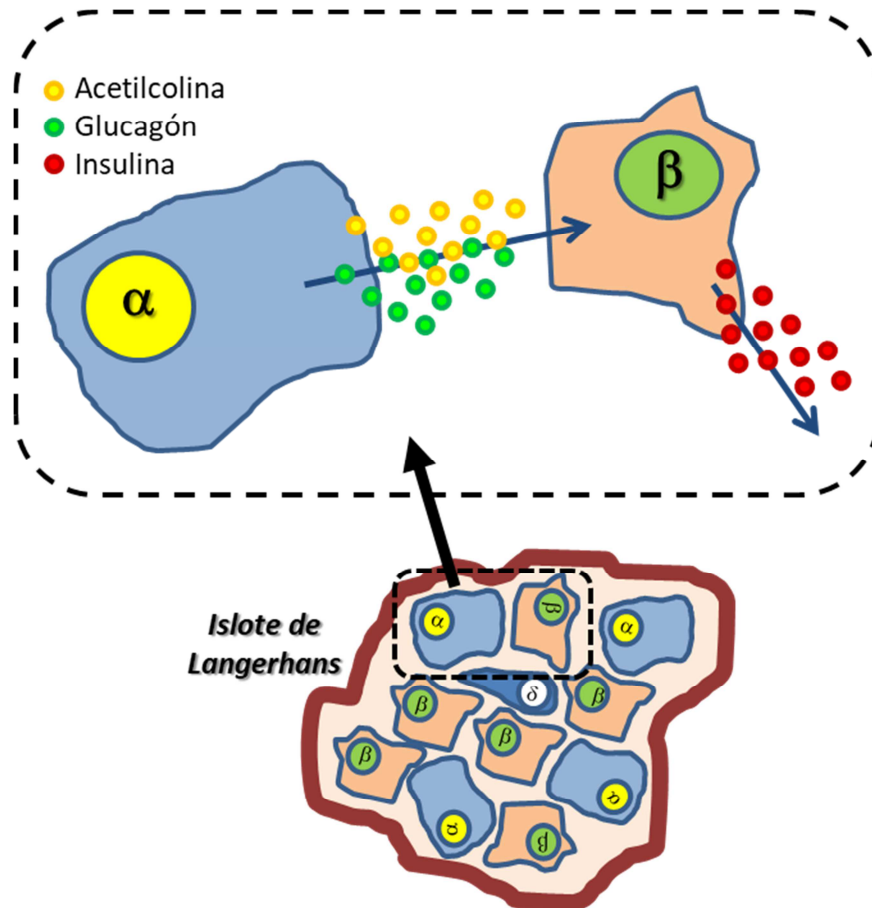


Figura 42: Liberación y acción paracrina de acetilcolina y glucagón a partir de las células α pancreáticas con respecto a la liberación de insulina en las células beta pancreáticas.

En cuanto a la dimetilamina, existen pocos datos bibliográficos acerca de este metabolito en el contexto de la DM. Se ha descrito una asociación entre resistencia a la insulina y niveles plasmáticos de dimetilarginina asimétrica (ADMA) (93), dichos niveles podrían estar potenciados no solo por un aumento de su síntesis durante la metilación de residuos de proteína ocurrida en las proteólisis, sino por una disminución en la degradación hidrolítica de la ADMA a través de la dimetilarginina dimetilamino hidrolasa, lo cual generaría una disminución de la cantidad de dimetilamina en orina. Esta inhibición puede ser originada, en general,

por las especies reactivas de oxígeno, especialmente por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas(114).

En la evaluación del ácido orgánico hipurato, *Van der Kloet et al.*, detectaron niveles significativamente inferiores, en muestras de orina de 24h, en un grupo de diabéticos que progresaron a enfermedad renal respecto al grupo que no lo hizo (115), lo que se relaciona con nuestros resultados.

Son varios los estudios que relacionan, a través de la metabolómica, CrP y la creatinina con la DM2. En el estudio realizado por *Ripley et al.*, mediante espectroscopia de resonancia magnética con fósforo-31 (^{31}P -MRS), un método de imagen cuantitativo in vivo modificado, demostraron que el CrP y el ATP se reducen en el músculo esquelético de sujetos con DM2 con respecto al grupo con tolerancia normal a la glucosa. La fuerte correlación inversa entre el CrP frente a la HbA1c y los test de tolerancia oral a la glucosa, así como la correlación directa frente a la sensibilidad a la insulina y la función de las células beta, respalda el concepto de que la disminución basal de CrP en el músculo esquelético está relacionado con determinantes clave de la homeostasis de la glucosa. Por otro lado, aunque la reducción de CrP y ATP no debe interpretarse como sinónimo de función mitocondrial deteriorada, son consistentes con un defecto en la misma y podrían contribuir a la resistencia a la insulina en individuos con DM2 (116).

Partiendo de la premisa de que los pacientes con DM2 presentan una alteración en la producción de energía del miocardio y en la reserva de perfusión miocárdica, *Levelt et al.* utilizaron la misma tecnología que el grupo de estudio anterior (^{31}P -MRS) para medir el ratio miocárdico de CrP/ATP en pacientes con DM2 y en normoglucémicos durante la realización de ejercicio y en reposo. Además de obtener en situación basal de reposo una menor ratio miocárdico CrP/ATP en pacientes con DM2 que en el grupo normoglucémico, dicha ratio disminuyó en el grupo DM2 durante la realización de ejercicio con respecto a los valores basales, mientras que en grupo normoglucémico los valores aumentaron. Estos resultados nos indican que el CrP/ATP se correlaciona con la alteración de la oxigenación y la perfusión, y que el déficit energético preexistente en la miocardiopatía diabética, además, se ve agravado en situación de ejercicio (117).

Si extrapolamos nuestros resultados con respecto a estos dos estudios, observamos en el caso del grupo Dm, que el CrP se encuentra también disminuido, pudiendo verse reflejada la disminución de la producción de CrP muscular en las muestras de orina. Como dato interesante, en el grupo pDm se observan valores medios mayores que en el grupo nG, pudiendo reflejar un intento a nivel muscular de aumentar la perfusión y la producción de energía antes de que se produzca la alteración a consecuencia de un agravamiento de la enfermedad.

Siguiendo la estela metabólica de su precursor, el CrP, la creatinina de nuestro estudio también se encuentra disminuida de manera significativa en el grupo Dm, hecho que es apoyado por los estudios de *Yoursi et al.*, explicado anteriormente, donde encontraron que la creatinina se encuentra disminuida en orina, de manera estadísticamente significativa, en el grupo DM2 con respecto al grupo normoglucémico (108). En la misma línea el grupo de *Liu et al.*, observó niveles de creatinina plasmática, disminuidos tanto en pacientes con DM2, como en pacientes que también presentaban además enfermedad coronaria (81).

Los elevados VIP scores obtenidos para la creatinina y el CrP, así como las diversas referencias que apoyan estos resultados, postulan este tándem metabólico como posible futuro marcador de evolución del continuo disglucémico en estudios metabólicos, aunque sin dejar de tener en cuenta la función renal y la masa muscular en la valoración del mismo.

En nuestro estudio el citrato se encuentra disminuido significativamente en el grupo Dm, mientras que el cis-acnitato se encuentra aumentando de manera significativa. Los resultados de los estudios metabólicos acerca del ciclo de Krebs no son uniformes en su totalidad. El grupo de *Wei et al.* demostró que el aumento de los niveles en orina de intermediarios del ciclo de krebs en ratones diabéticos, como el citrato y el cis-acnitato, podría reflejar la presión del sistema causada por la hiperglucemia sobre la función mitocondrial (118).

El grupo de *Castro et al.* han estudiado que la aconitasa, enzima que convierte el citrato en isocitrato, previa formación de cis-acnitato, se puede ver inactivada por las especies reactivas del oxígeno (ROS), en concreto por el peroxidonitrito (ONOO⁻), lo cual se ha identificado en este estado en estudios proteómicos de modelos de animales con DM, entre otras enfermedades(119). La

aconitasa tiene un grupo Fe-S el cual es modificado por la oxidación. Cuando el grupo sulfoferroso de la aconitasa mitocondrial se encuentra en su forma activa $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, el citrato se consume en la mitocondria, a través el ciclo del ácido cítrico, con su paso a isocitrato. Agentes oxidantes como ONOO^- lo oxidan produciendo la inactivación del enzima aconitasa mitocondrial, lo que produce un acúmulo de citrato mitocondrial que va a favorecer su flujo hacia el exterior de la mitocondria para participar en la síntesis de ácidos grasos (119). Este acontecimiento nos relaciona el citrato como metabolito que podría participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el caso de no poder controlar las ROS en la mitocondria, pudiendo desarrollarse finalmente la DM2. Tendríamos que hacer un estudio más exhaustivo para poder entender por qué en las muestras de orina de nuestro grupo Dm se encuentra el citrato significativamente disminuido con respecto al grupo pDm y el grupo nG, ya que es el acúmulo de citrato por inhibición de la aconitasa mitocondrial, a partir de ROS, lo que puede desencadenar la resistencia a la insulina y el estado prediabético. En las mitocondrias, los antioxidantes reducen el contenido de grasa y protegen contra la resistencia a la insulina manteniendo las ROS controladas (119). En este caso, cabe suponer que la producción mitocondrial de cis-aconitato se va a ver disminuida en presencia de ROS.

Por otro lado, en el estudio realizado por *Murphy et al.* se ha descubierto recientemente, en humanos, otro metabolito que deriva del cis-aconitato, el itaconato, el cual se encarga de inhibir la succinato deshidrogenasa (SDH) evitando el paso de fumarato a succinato. Se sabe que el succinato, intermediario del ciclo de Krebs, se acumula en situaciones de estrés celular en los macrófagos, activando la señal proinflamatoria, pero además también aumenta en situación de isquemia, aumentando las especies reactivas del oxígeno en la mitocondria (figura 43). Estos dos efectos provocados por el succinato son contrarrestados por el itaconato (120). Como la producción de itaconato depende del cis-aconitato, y este depende de la actividad de la aconitasa mitocondrial, sería interesante poder evaluar cuál es el punto de inflexión en el que hay suficiente cis-aconitato para poder producir itaconato y así poder contrarrestar la producción de ROS, así como cuándo se sobrepasan los límites de ROS que inhiben la aconitasa mitocondrial dejándose de

producir cis-aconitato y por lo tanto itaconato. Este punto de inflexión puede ser importante en el continuo disglucémico, ya que nos puede indicar el punto de inicio de la resistencia a la insulina y por lo tanto de la patología diabética.

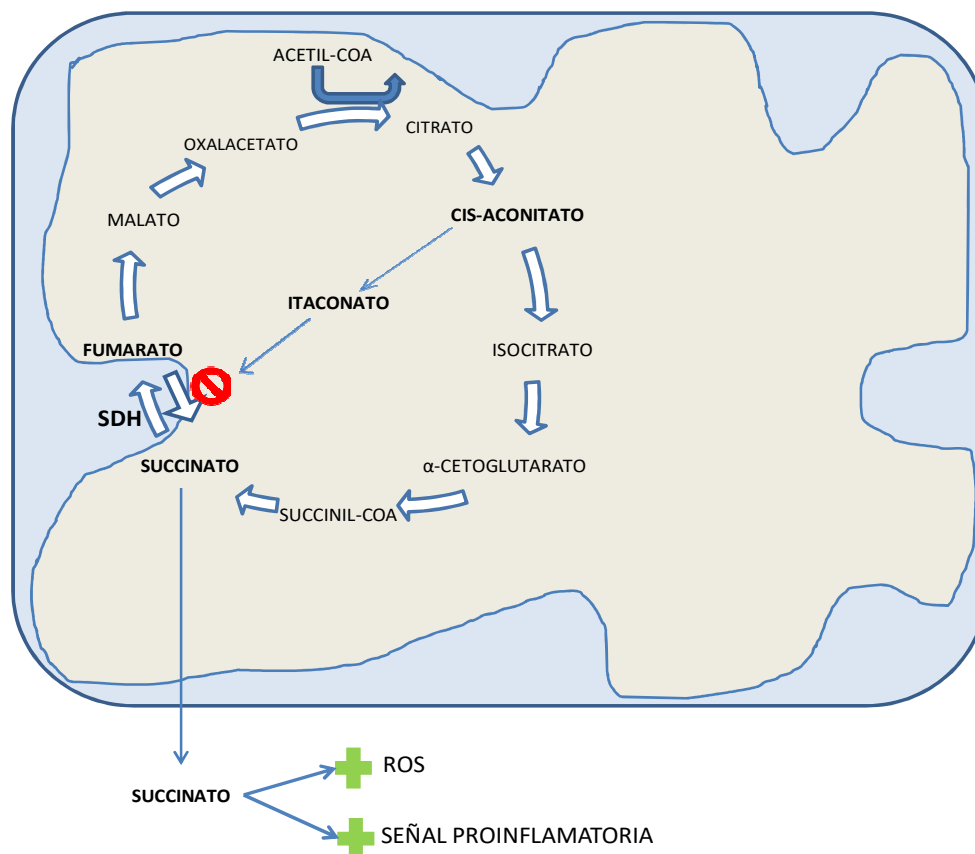


Figura 43: Inhibición de Succinato deshidrogenasa (SDH) por itaconato.

Son distintos los estudios que relacionan el malonato, sus derivados metabólicos y la actividad enzimática de las distintas rutas metabólicas, con la patología diabética. El aumento de actividad de la enzima ácido graso sintasa se ha asociado a pacientes con diabetes (121), como también lo está los elevados niveles de malonil-CoA y la tendencia lipogénica en dicha patología (122). El malonato también es un análogo del succinato (metabolito intermediario del ciclo de Krebs) que actúa como inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa, por lo que ralentiza el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria mitocondrial (figura 40). Se ha relacionado con la patología CV, incluyendo la aterosclerosis, la HTA y el fallo cardíaco (123).

La enzima malonil-coA sintetasa (ACSF3) mitocondrial se encarga de eliminar el malonato convirtiéndolo en malonil-coA, el cual, además de convertirse en acetil-coA por descarboxilación a través de la enzima malonil-coA descarboxilasa (MLYCD), participa en la malonilación de los restos de lisina de las proteínas de la matriz mitocondrial, pudiendo estar relacionado con la regulación postranscripcional del metabolismo mitocondrial (124). El grupo de *Bowman et al.* vió cómo los modelos de ratones con obesidad y DM presentaban una mayor malonilación de los restos de lisina de las proteínas mitocondriales. De acuerdo con este modelo de metabolismo de malonato, la pérdida de actividad de MLYCD genera un aumento dramático en proteínas maloniladas mitocondriales debido a un aumento en la concentración de malonil-CoA y con ello una disminución de malonato (124).

El malonil-CoA, que participa en la síntesis y degradación de ácidos grasos, también se sintetiza por la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y es a su vez un regulador de CPT-1, enzima clave del transporte de grasos al interior de la mitocondria para su degradación. En el músculo, en el que la síntesis de ácidos grasos carece de importancia, el malonil-CoA se produce por acción de una isoenzima específica de la acetil-CoA carboxilasa asociado a la membrana externa de la mitocondria, en donde también se sitúa CPT-1, por lo que los cambios de su actividad se trasladan rápidamente a la actividad del transportador. En el músculo con resistencia a la insulina los niveles de malonil-CoA están aumentados, lo que estaría de acuerdo con la importancia de la isoenzima muscular, codificada por el gen ACACB y cuyas variantes se han asociado recientemente con la obesidad y diabetes (125). Por otro lado, como ya sabemos, la leptina, que está implicada en la obesidad y DM2, en las células de tejido adiposo reduce la expresión de ACC produciéndose una disminución del malonil-CoA (figura 14) (39).

Se ha visto que la relación entre los lípidos y la aparición de la DM2 se puede producir en dos fases: una fase temprana, previa al aumento de los niveles de ácidos grasos y triacilglicerolos en sangre, donde la célula muscular podría tener un defecto muy sutil, tal vez una desregulación del par Acetil-CoA carboxilasa/CPT-1, que le imposibilitaría la degradación completa de los ácidos grasos, provocando la acumulación de lípidos que daría lugar a la resistencia a insulina; una fase tardía, que aparecería cuando la secreción de insulina no pudiese ya controlar la

resistencia, se produciría un aumento de los niveles de lípidos circulantes, cuya concentración sería ahora suficiente para vencer el bloqueo existente para su degradación (125). Esta es la paradoja que presenta la hipótesis lipogénica de la DM2, en la que, por una parte, las células musculares no utilizan glucosa por oxidar preferentemente los ácidos grasos, y por otra, estas células acumulan ácidos grasos porque su capacidad de oxidarlos de forma eficiente está disminuida.

En nuestro estudio, el malonato se encuentra disminuido de manera significativa en el grupo Dm con respecto de los otros dos grupos, lo cual podría tener relación con el aumento de la malonilación de los restos de lisina de las proteínas de la matriz mitocondrial, ya que se requiere de malonil-coA, el cual es el sustrato de la vía de eliminación de malonato. Se tendrían que hacer estudios con pacientes diabéticos para ver si existe una relación entre la patología y el aumento de la malonilación de los restos de lisina de las proteínas de la matriz mitocondrial. También podría tener relación la disminución del malonato con un aumento de la síntesis de malonil-coA para llevar a cabo la síntesis de triacilgliceroles en respuesta a la resistencia a la insulina y el estado hiperinsulinémico inicial.

Tras lo expuesto, aunque con algunas discrepancias, el estatus diabético podría realizar una presión sobre las necesidades energéticas que forzara a los mecanismos básicos, como el ciclo de Krebs, en la obtención de la misma. Ello puede generar una tendencia a encontrar elevados los niveles de ácidos intermediarios de dicho ciclo en sangre, sin embargo, variaciones inducidas por el propio control de la diabetes, otros tratamientos farmacológicos o diversas dietas, pueden modificar puntualmente estos hechos. Podemos tomar como ejemplo el citrato de nuestro estudio, disminuido en la orina de los diabéticos. Es cierto que desconocemos su valor plasmático, pero si por el motivo energético argumentado estuviese más elevado en el grupo Dm (junto al cis-aconitato), también podríamos encontrar su valor disminuido en orina bajo la presencia de un entorno más ácido que potenciara su mayor reabsorción tubular, generando una hipocitraturia relativa respecto a los otros grupos. La hipocitraturia es una condición que promueve la litiasis renal, la cual está relacionada en gran medida con afectos por DM, entre otras patologías (126). Esta mayor reabsorción de citrato no tendría

efecto sobre la cantidad de cis-aconitato eliminada por orina, que podría seguir más elevada en el grupo Dm.

Por otro lado, en nuestro estudio el etanol se encuentra elevado de manera significativa en el grupo Dm con respecto a los otros dos grupos. Hay poca evidencia científica de la relación entre etanol y DM2. El grupo de investigación de *Li et al.* realizó un metanálisis a partir de 197 artículos en el que se relaciona una de las enzimas de la vía de degradación del etanol con la DM2 y la retinopatía diabética, la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2). La ALDH2 elimina el aldehído producido en el metabolismo del etanol y el estrés oxidativo. Se ha descubierto un polimorfismo de la ALDH2, el rs671, relacionado con el riesgo de padecer DM2 y retinopatía diabética. Este polimorfismo produce una disfunción en la ALDH2, lo que se asocia a un acúmulo de aldehído, el cual se relaciona con procesos inflamatorios y produce deterioro de la función de vasodilatación de los vasos de la retina, lo que conlleva al desarrollo de la retinopatía diabética en la DM2 (127). Esta disfunción de la ALDH2 y el subsiguiente acúmulo de aldehído posiblemente actúe como *feedback* negativo, inhibiendo la acción de la alcohol deshidrogenasa, la enzima que se encarga de degradar el etanol en acetaldehído y por este motivo el etanol podría encontrarse elevado en los pacientes con DM2 de nuestro estudio (figura 44).

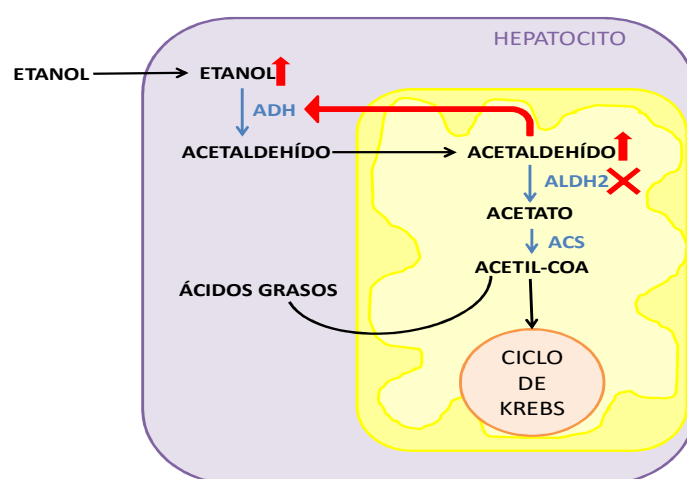


Figura 44: Posible mecanismo de elevación del etanol en DM2 por disfunción ALDH2. ADH: Alcohol deshidrogenasa; ALDH2: Aldehído deshidrogenasa 2; ACS: Acetil-coA sintetasa.

Son varios los estudios en los que se ha visto que la trigonelina reduce las concentraciones de glucosa en sangre tanto en ratas como en humanos. La administración de trigonelina en ratas con DM protege las células β -pancreáticas, aumentando la producción de insulina y la sensibilidad a la misma (40,97). Además, la trigonelina regula enzimas del metabolismo de la glucosa como son la glucokinasa, la glucosa-6-fosfatasa, enzimas clave en la glucólisis, y del metabolismo de los lípidos como la sintasa de ácidos grasos y la carnitina-palmitoiltransferasa (97).

Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y de la α -glucosidasa mejoran la sensibilidad a la insulina en pacientes con DM2 además de proteger las células β -pancreáticas. En el grupo de *Hamden et al.* se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de la trigonelina del fenogreco sobre la actividad de la DPP-4 y la α -glucosidasa, así como sobre la arquitectura de las células β -pancreáticas y los test de tolerancia a glucosa y almidón en ratas diabéticas. Observaron cómo las ratas diabéticas que habían sido suplementadas con trigonelina tenían inhibidas la actividad de DPP-4 y α -glucosidasa, tanto en plasma como en el intestino delgado. Además, se produjo un aumento de GLP-1 (del inglés *glucagon-like peptide-1*), suprimiendo el aumento de los niveles de glucosa y mejorando los resultados de los test de tolerancia a glucosa y almidón (figura 45) (97). Estos resultados muestran el posible potencial que posee la trigonelina como tratamiento para la DM2 (97).

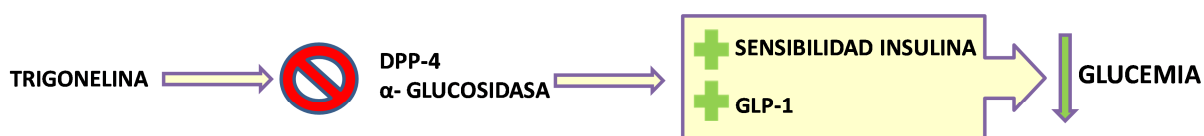


Figura 45: Inhibición de DPP-4 y α -glucosidasa mediada por trigonelina. DPP-4: dipeptidil peptidasa-4; GLP-1: *glucagon-like peptide-1*.

En el estudio que realizó el grupo de *Li et al.*, demostraron que la trigonelina reduce la nefropatía diabética y la resistencia a insulina en ratas con DM2 a través

de los receptores activadores por proliferación de peroxisomas (PPAR)- γ (128). En cuanto a los mecanismos moleculares implicados, vieron que la trigonelina estimuló la expresión proteica del PPAR- γ y suprimió la actividad del transportador de glucosa tipo 4, así como la expresión proteica del factor de necrosis tumoral α y leptina en ratas con DM2(128).

En el grupo de *Tharahaswari et al.*, realizaron un estudio con ratas a las que se les inducía DM2 y se les administraba trigonelina, observando un efecto activador de los agonistas PPAR- γ además de un efecto protector del páncreas mediante la disminución del estrés en el retículo endoplasmático y el estrés oxidativo producido por el daño celular(40).

En nuestro estudio, resulta interesante observar una menor concentración de trigonelina en el grupo pDm y una disminución más acusada en el grupo Dm con respecto al grupo nG. Como hemos visto, la trigonelina actúa sobre distintos mecanismos favoreciendo la disminución de la progresión de la enfermedad microvascular, sobre todo. La disminución progresiva de los niveles de este alcaloide en relación con la resistencia a la insulina, podría orientar al empleo de estos valores como factor pronóstico al desarrollo de la diabetes a través de los diversos mecanismos expuestos o, al menos, tener en cuenta la trigonelina en cuanto a una elaboración dietética adecuada en personas que tengan un mayor riesgo a padecer DM2.

Contrario a lo que cabría esperar, encontramos estudios en los que los resultados se comportan de manera inversa a los resultados de nuestro estudio. En la mayoría de los estudios AAAR como tirosina y los AAR leucina, isoleucina y valina (54,71-75,101,104,129), así como sus derivados gamma-glutamil (71), están aumentados en el plasma de los grupos de diabéticos y de pacientes con patología cardiovascular.

De los trabajos que asocian el 3-m-2-oxovalerato con DM2, como el realizado por *Menni et al.*, donde lo relacionan como predictor de TAG en muestras de plasma y de orina, los niveles estaban significativamente aumentados en el grupo DM2 con respecto de los que presentaban TAG (130). También en el grupo de *Shi et al.* observaron un aumento del 3-metil-2-oxovalerato y glutamato en muestras de plasma, durante el seguimiento del grupo de DM2 (104). De forma

similar, el grupo de *Ottosson et al.* obtuvo valores elevados de glutamato en muestras de plasma de pacientes con DM2 y enfermedad cardiovascular (106).

Como ya sabemos, la colina aparece como forma de PC cuando se relaciona con DM. En contra de los que cabríamos esperar, las diacilPC se encuentran significativamente aumentadas en suero el grupo DM2 en el estudio de *Floegel et al.* (113) y, en el grupo de *Ha et al.*, la lysoPC también se encuentra significativamente elevada en las muestras de plasma de los pacientes con DM2(131).

En el grupo de *Hameed et al.*, donde utilizan muestras de plasma y suero, el citrato también se encuentra significativamente elevado en los pacientes con DM2, mientras que el cis-aconitato se encuentra significativamente disminuido (101). En otro estudio realizado por *Messana et al.*, los niveles de citrato, dimetilamina e hipurato también fueron significativamente mayores en las muestras de orina de los pacientes con DM2 con peor control glucémico, con respecto a los pacientes DM2 con mejor control glucémico y el grupo de no diabéticos (132). Sin embargo, en nuestro estudio, los niveles de dimetilamina se encuentran significativamente disminuidos en el grupo Dm, en la línea de lo que observamos para la colina en dichos pacientes, y también los de citrato e hipurato.

7.3. Metabolitos implicados en la diferenciación de los grupos glucémicos a lo largo del continuo disglucémico.

Como ya hemos visto, son algunos los metabolitos que, a pesar de no tener significancia estadística en nuestro estudio, sí tienen una tendencia entre los grupos de estudio.

El grupo de *Hameed et al.* realizaron una revisión bibliográfica sobre los metabolitos que pueden ser posibles biomarcadores de predicción de riesgo de DM2 donde el indoxisulfato se encontró disminuido en plasma y suero en los pacientes con DM2 (101), tendencia que también se observa en nuestro trabajo. En otra línea, el grupo de *Yang et al.* consideran que el indoxisulfato puede inducir la hipertrofia de los cardiomiocitos al promover el estrés oxidativo en la enfermedad renal crónica (ERC). Este metabolito induce la generación de ROS en los

cardiomiocitos mediante la disminución de UCP2 en la ERC. Estos resultados sugieren que la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por indoxisulfato es debida, en parte, a la inhibición de la señalización de AMPK / UCP2 y al aumento del estrés oxidativo (133). Como ya hemos visto, la AMPK es un sensor del estado nutricional de la célula (39), cuya activación está implicada en diversas rutas, como la activación de PPARs, los cuales están implicados en el control de la homeostasis de glucosa y lípidos (40).

El formato es otro de los metabolitos que presenta una tendencia en el desarrollo de la DM2, presentando una menor concentración en el grupo Dm. El grupo de *Friedrich et al.*, evaluaron en una población de 3986 individuos, la variación de biomarcadores de la homeostasis de glucosa a lo largo de 5 años con la presencia inicial de ciertos metabolitos en orina, encontrando que niveles originalmente más elevados de formato se relacionaban con una disminución de la hemoglobina glicosilada a lo largo del tiempo, es decir, con un mejor control homeostático de la glucemia (134). Ello tiene cierto paralelismo con nuestro estudio, ya que encontramos una tendencia a la disminución de los niveles de formato en el grupo en el que peor es la homeostasis de la glucosa, el Dm, por lo que podría ser de utilidad como posible marcador pronóstico.

Shao et al. realizaron un estudio con pacientes DM2, con y sin nefropatía diabética, donde identificaron 61 metabolitos en suero y 46 metabolitos en orina como potenciales biomarcadores relacionados con la nefropatía diabética. En este estudio observaron que el mioinositol está disminuido en suero y en orina en pacientes que presentan DM2 con respecto a los que presentan DM2 y nefropatía diabética (100). En nuestro estudio, el mioinositol se encuentra más elevado en orina en el grupo Dm, que en el grupo pDm y que en el grupo nG, siguiendo una tendencia ascendente en concentración a medida que avanza la patología. Este hallazgo está en línea con los resultados del grupo de *Shao et al.*, ya que propone que el mioinositol aumenta conforme progresa la nefropatía diabética. Nosotros encontramos una tendencia al aumento de este marcador en aquellos pacientes con más riesgo de padecerla, los del grupo Dm. Sería interesante ver, dentro de nuestro grupo Dm, en los que tienen alterada la MAU o la creatinina, las diferencias de concentración de este metabolito con respecto a los que no tienen afectación

renal. Además, sería interesante poder averiguar si dicho aumento responde a un intento de nuestro metabolismo por mejorar la resistencia a la insulina, aumentando su síntesis endógena en aquellos pacientes con DM2.

En el estudio que realizaron el grupo de *Shao et al.* la xantina, precursor de la xantosina, se encuentra más disminuida en el grupo con nefropatía diabética que en el grupo con DM2 (100). En nuestro estudio la xantosina se encuentra también disminuida en el grupo Dm con respecto a los otros dos grupos, por lo que podríamos decir, al igual que con el mioinositol, que sería interesante observar la concentración de la xantosina en el grupo Dm que tienen alterada la función renal, para ver si los niveles son más bajos en este grupo. Estas observaciones forman parte de un futuro e inminente estudio sobre el análisis de marcadores de lesión de órgano diana.

El grupo de *Ho et al.* evaluaron la asociación de los cambios en los rasgos cardiometabólicos en 217 metabolitos analizados, tanto de manera transversal como longitudinal, entre 2.383 participantes de la cohorte de Framingham Offspring. El índice de masa corporal (IMC) se asoció con 69 de 217 metabolitos, entre los cuales se encuentran metabolitos del ciclo del ácido cítrico (isocitrato y aconitato), del metabolismo del triptófano, ciclo de la urea, metabolitos relacionados con la creatina (colina) y del metabolismo de los ácidos nucleicos (xantosina), entre otros. Observaron, además, una superposición considerable en los perfiles de metabolitos entre el IMC, la grasa abdominal, la RI y la dislipidemia, una superposición media de los perfiles de metabolitos entre el IMC y la hiperglucemia, y poca superposición con la glucosa en ayunas o la presión arterial elevada (135). Aunque la obesidad y los rasgos cardiometabólicos comúnmente se superponen, las vías subyacentes siguen estando definidas de manera incompleta (135). En este caso, la xantosina, entre otros metabolitos que hemos descrito en nuestro estudio, aparece como metabolito implicado en rasgos cardiometabólicos e IMC. La patología diabética, es una patología multifactorial que se ve afectada por el conjunto de patologías que componen el síndrome metabólico, por eso es importante tener conocimiento de los metabolitos que están implicados en obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedad renal, entre otras, para

tener un amplio conocimiento de los metabolitos que se pueden ver implicados en el síndrome metabólico.

El grupo de *Rhee et al.* combinaron la epidemiología y la metabolómica para observar los cambios de los metabolitos plasmáticos de 1434 pacientes sin IRC al inicio del estudio Framingham Heart, observaron que, al cabo de 8 años, 123 individuos del estudio desarrollaron IRC (eGFR<60 mL min/1.73 m²). Se obtuvieron 16 metabolitos, entre los cuales la xantosina, colina, aconitato e isocitrato fueron identificados como potenciales marcadores de riesgo de IRC (136). Estos datos vuelven a poner de manifiesto la relación que puede tener la patología renal con el síndrome metabólico y en concreto con la DM2, viéndose afectadas las mismas vías en el caso de progresión de la enfermedad.

Como hemos podido observar, son varios los metabolitos con diferencias significativas entre el grupo Dm con respecto al grupo pDm y nG. En la tabla 12 se muestra la comparativa entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y los referidos en la bibliografía, salvando la circunstancia de nuestra orientación metodológica hacia la obtención de muestras no invasivas y el empleo de orina en vez de sangre.

Tabla 12: Comparativa resultados del estudio actual vs estudios previos. En azul se señalan los metabolitos con los mismos resultados que nuestro estudio y en rojo los contrarios. (M: músculo; O: orina; P: plasma, R: ratón; S: suero).

METABOLITOS	Dm		pDm	
	ESTUDIOS PREVIOS	ESTUDIO ACTUAL	ESTUDIOS PREVIOS	ESTUDIO ACTUAL
AA Y α -CETOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA	↓ Leucina (P) ⁽⁸¹⁾ ↓ AAR (S) ^(102,103) ↑ Leucina (P) ^(54,71-75,101,104,128)	↓ Leucina (O)		↑ Leucina (O)
	↓ 3-metil-2-Oxovalerato (P) ⁽⁸¹⁾ ↑ 3-metil-2-Oxovalerato (P) ⁽¹⁰⁴⁾ (P,O) ⁽¹³⁰⁾	↓ 3-metil-2-Oxovalerato (O)	↓ 3-metil-2-Oxovalerato (P, O) ⁽¹³⁰⁾	↑ 3-metil-2-Oxovalerato (O)
AA AROMÁTICOS	↓ Tirosina(S) ^(102, 130) (P) ⁽⁸¹⁾ ↑ AAAr (Tirosina) (P) ^(54,71-75,104,128)	↓ Tirosina (O)		
AA POLARES CON CARGA	↓ Lisina (P) ⁽¹⁰⁵⁾ (S) ^(102,106)	↓ Lisina (O)		
	↓ Glutamato (O) ^(100, 107) (S) ⁽¹⁰²⁾ ↑ Glutamato (P) ^(104, 105)	↓ Glutamato (O)		↑ Glutamato (O)
ORGANONITROGENADOS	↓ Colina ⁽¹¹¹⁾ ↓ Lysofosfatidilcolina (S) ⁽¹¹²⁾ ↓ Acilalquilfosfatidilcolina (S) ⁽¹¹²⁾ ↓ Fosfatidilcolina (P) ⁽¹⁰⁴⁾ ↑ Lysofosfatidilcolina (P) ⁽¹³¹⁾ ↑ Diacilfosfatidilcolina (S) ⁽¹¹²⁾	↓ Colina (O)	↑ Colina ⁽¹¹¹⁾	↑ Colina (O)
	↑ Dimetilamina (O) ⁽¹³²⁾	↓ Dimetilamina (O)		
	↓ metil-Histidina (O) ⁽¹⁰⁷⁾	↓ metil-Histidina (O)		
METABOLISMO ENERGÉTICO	↓ CrP (M) ^(115, 116) ↓ Cr (O) ⁽¹⁰⁷⁾ (P) ⁽⁸¹⁾	↓ CrP(O) ↓ Cr(O)		↑ CrP(O)
ÁCIDOS ORGÁNICOS	↓ Citrato (S) ⁽¹⁰²⁾ ↑ Citrato (OR) ⁽¹¹⁷⁾ (O) ⁽¹³²⁾ (P,S) ⁽¹⁰¹⁾ ↑ cis-Aconitato (OR) ⁽¹¹⁷⁾ ↓ cis-Aconitato (P,S) ⁽¹⁰¹⁾	↓ Citrato (O) ↑ cis-Aconitato (O)		
	↓ Malonato (R) ⁽¹²³⁾	↓ ↓ Malonato (O)		↓ Malonato (O)
	↓ Hipurato (O) ⁽¹¹⁴⁾ ↑ Hipurato (O) ⁽¹³²⁾	↓ ↓ Hipurato (O)	↓ Hipurato (O) ⁽¹¹⁴⁾	↓ Hipurato (O)
METABOLISMO DE LOS ALCOHOLES Y ALCALOIDES	↑ Aldehído ⁽¹²⁶⁾	↑ Etanol (O)		
		↓ ↓ Trigonelina (O)		↓ Trigonelina (O)
INDOXYL SULFATO	↓ Indoxil sulfato (P, S) ⁽¹⁰¹⁾	↓ ↓ Indoxil sulfato (O)		↓ Indoxil sulfato (O)
FORMATO	↓ Formato (P) ⁽¹³⁴⁾	↓ ↓ Formato (O)		↓ Formato (O)
MYOINOSITOL	↑ Mioinositol (S,O) ⁽¹⁰⁰⁾	↑ ↑ Mioinositol (O)		↑ Mioinositol (O)
XANTOSINA	↓ Xantina (S,O) ⁽¹⁰⁰⁾	↓ ↓ Xantosina (O)		↓ Xantosina (O)

7.4. Fortalezas y limitaciones del presente trabajo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio ofrecen una adecuada caracterización fenotípica de las categorías glucémicas teniendo en cuenta la coherencia y diferencias registradas en la tabla descriptiva de la muestra (tabla 7) en la que podemos observar un HOMA e IMC mayor en pDm que en nG o valores de triglicéridos que permiten diferenciar de manera significativa cada una de las categorías glucémicas.

Otra de las fortalezas del estudio es haber encontrado un grupo de metabolitos que tienen una implicación en la diferenciación a lo largo del continuo disglucémico, además de poder ser posibles predictores de desarrollo de prediabetes y por lo tanto poder ser útiles para prevenir el desarrollo de la patología diabética.

Además, como ya hemos visto en el apartado de resultados, la curva ROC obtenida para el grupo Dm muestra una muy buena capacidad de predicción del modelo con un área bajo la curva (AUC) de 0,984 y un área bajo la curva (AUC) de 0,9308 tras la validación cruzada. Esto nos indica que los metabolitos descritos en nuestro estudio nos van a servir para diferenciar el grupo de Dm de los otros dos grupos con una sensibilidad y una especificidad elevadas.

En cuanto al grupo pDm, también ofrece una buena capacidad de predicción para su modelo, con sobreajuste, aunque no tan exacto como en el modelo del grupo Dm. Ello es debido a que pese a que el AUC es de 0.91, tras la validación cruzada el AUC es tan solo de 0.76. El hecho de que el valor de la “n” para este grupo no fuera muy elevado nos puede limitar que sea más concluyente, al ser más difícil ajustar con mayor exactitud este modelo.

Por otro lado, los resultados obtenidos dentro del análisis metabolómico le dan robustez a la utilización de orina como futura muestra de fácil obtención para poder diferenciar metabolómicamente grupos de población dentro de distintas categorías glucémicas, ya que, a pesar de ser una muestra que posee una mayor variabilidad al verse afectada por la dieta, estilo de vida, patologías, etc., ha demostrado su utilidad en estudios metabolómicos.

Como se ha podido observar, existen discrepancias entre los distintos estudios y el comportamiento de los metabolitos en los distintos fluidos biológicos. Cabe esperar que la realización de más estudios metabolómicos de forma más y mejor estandarizada, y con un mayor número de pacientes nos permita encontrar cual es el comportamiento metabolómico que más se ajusta a la patología diabética.

La caracterización y obtención de pacientes prediabéticos es posiblemente la mayor limitación que ha presentado al inicio nuestro estudio. En posteriores trabajos, en esta línea, se debería subsanar este aspecto. El definir qué parámetros analíticos nos van a distribuir a los individuos del estudio dentro de este grupo ha sido un gran handicap, además de la dificultad de reclutar a estos pacientes, ya que como generalmente son pacientes jóvenes sin patología aparente no acuden a realizarse ningún tipo de análisis. Una alternativa podría ser citar de manera aleatoria a un grupo de pacientes dentro de un rango de edad, o también reclutar aquellos en los que exista alguna posible sospecha de patología diabética incipiente. Pero, a pesar de esta limitación, es importante también recalcar que una de las fortalezas que presenta nuestro estudio es la mejor caracterización fenotípica de los pacientes pDm, al utilizar una herramienta que puede ser más precisa que la carga de glucosa, así como poder implementar en un futuro la utilización de la orina en la práctica clínica de este tipo de análisis.

7.5. Futuras líneas de trabajo.

Nuestro próximo paso, en esta línea, es desarrollar un estudio que nos permita demostrar qué metabolitos poseen un valor predictivo para las complicaciones diabéticas macro y microvasculares y, sobre todo, para el desarrollo de DM2 “de novo”. Otro aspecto a analizar, para acabar de caracterizar el continuo disglucémico desde la metabolómica, sería el análisis de potenciales marcadores de resistencia insulínica en grupos de nG y pDM, entendiendo que la primera fase del continuo es la resistencia a la insulina.

8. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado en nuestro estudio son las siguientes:

1. Se han caracterizado un conjunto de 15 metabolitos que identifican a pacientes diagnosticados de DM2 respecto a individuos normoglucémicos y en situación prediabética: Leucina, 3-metil-2-Oxovalerato, Lisina, Tirosina, Glutamato, Colina, Dimetilamina, Creatinina, Creatín-fosfato, Citrato, cis-Aconitato, Malonato, Hipurato, Trigonelina y Etanol.
2. Se ha conseguido caracterizar 1 metabolito, la Colina, cuya elevación en el grupo prediabéticos diferencia significativamente al estado prediabético de la DM2 y de los individuos normoglucémicos, relacionando las fases iniciales de la diabetes, principalmente, con el control paracrino de secreción de insulina.
3. Se han identificado 14 metabolitos en los que podemos observar un gradiente evolutivo a lo largo del continuo disglucémico (de nG a Dm) con valores crecientes para Mioinositol y decrecientes para 3-m-2-Oxovalerato, Citrato, Dimetilamina, Malonato, N-nitrosodimetilamina, Creatinina, Trigonelina, Urea, Xantosina, 3-Indoxisulfato, Hipurato, m-Histidina y Formato.
4. De la interpretación de los resultados del presente estudio se deduce que las bases fisiopatológicas que llevan a la diabetes, suponen alteraciones en diversas vías involucradas en la producción/almacenamiento de energía, así como procesos reguladores a nivel pancreático para contrarrestar los efectos nocivos de la diabetes.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, Fernández-Fernández I. La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. Gaceta Sanitaria 2006;20:15-24.
- (2) Cases MM. Coste actual de la diabetes mellitus en España: el estudio eCostesDM2. Suplemento extraordinario Diabetes Práctica 2013:6.
- (3) Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS medicine 2006;3(11):e442.
- (4) International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas - 8th Edition. 2017; Available at: www.diabetesatlas.org, 2017.
- (5) Jakab Z. **Data and statistics DM**. Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>.
- (6) Gomis R, Artola S, Conthe P, Vidal J, Casamor R, Font B. Prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes ambulatorios con sobrepeso u obesidad en España. Estudio OBEDIA. Med Clin 2014;142(11):485-492.
- (7) Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, López-Alba A, López-Martínez N, Soria B. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes). Avances en diabetología 2013;29(6):182-189.
- (8) Paz S, Segura DG, Torres AR, Lizan L. Principales factores asociados al coste de la diabetes mellitus tipo 2: revisión de la literatura. Avances en Diabetología 2014;30(2):34-44.
- (9) Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diabetes, prediabetes y enfermedad cardiovascular, en colaboración con la European Society for the Study of Diabetes. Revista Española de Cardiología 2014;67(2).
- (10) Palacios A, Durán M, Obregón O. Factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo 2012;10:34-40.
- (11) Willems SM, Mihaescu R, Sijbrands EJ, Van Duijn CM, Janssens ACJ. A methodological perspective on genetic risk prediction studies in type 2 diabetes: recommendations for future research. Current diabetes reports 2011;11(6):511.
- (12) Comité Español Interdisciplinario para la Prevención Cardiovascular (CEIPC). Adaptación española de las guías europeas de 2016 sobre prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica. Gaceta Sanitaria 2017;31(3):255-268.

- (13) Lobos JM, Royo-Bordonada MA, Brotons C, Álvarez-Sala L, Armario P, Maiques A, et al. Guía europea de prevención cardiovascular en la práctica clínica: Adaptación española del CEIPC 2008. *Rev Esp Salud Publica* 2008;82(6):581-616.
- (14) Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2015;3(2):105-113.
- (15) Otero González A, Francisco Ad, Gayoso P, García F. Prevalencia de la insuficiencia renal crónica en España: Resultados del estudio EPIRCE. *Nefrología (Madrid)* 2010;30(1):78-86.
- (16) Gómez Huelgas R, Martínez Castela A, Artola Menéndez S, Górriz JL, Menéndez Torre E. Documento de Consenso sobre el tratamiento de la diabetes tipo 2 en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española de Nefrología* 2014;34(1):34-45.
- (17) Torres IV, Donlo IC. Situación actual del control de la diabetes mellitus tipo 2 en España. Identificación de las principales barreras en la práctica clínica diaria. *Medicina Clínica* 2013;141:3-6.
- (18) Bernardino ÁR, Polavieja PG, Fernández JR, Ríos MS. Prevalencia del síndrome metabólico y grado de concordancia en su diagnóstico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en España. *Endocrinología y nutrición* 2010;57(2):60-70.
- (19) Berlanga E, Casamitjana R. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA ENDOCRINA EN EL LABORATORIO CLÍNICO. *SEQC*. 2004.
- (20) DiStefano JK, Watanabe RM. Pharmacogenetics of anti-diabetes drugs. *Pharmaceuticals* 2010;3(8):2610-2646.
- (21) Johansen Taber KA, Dickinson BD. Genomic-based tools for the risk assessment, management, and prevention of type 2 diabetes. *Appl Clin Genet* 2015 Jan 7;8:1-8.
- (22) Romero-Mora LM, Durán-Íñiguez F, de Jesús Castro-Barajas F. Hiperglucemia en ayuno e intolerancia a la glucosa El papel de los antecedentes familiares directos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2013;51(3):308-312.
- (23) Khashayar P, Heshmat R, Qorbani M, Motlagh ME, Aminaee T, Ardalan G, et al. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors in a National Sample of Adolescent Population in the Middle East and North Africa: The CASPIAN III Study. *Int J Endocrinol* 2013;2013:702095.
- (24) Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014;99(6):1983-1992.

- (25) Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC medicine* 2017;15(1):131.
- (26) Paneni F, Costantino S. Diabetes and cardiovascular disease: let's push forward with translational research. *Cardiovasc Diagn Ther* 2015 Oct;5(5):407-411.
- (27) Langenberg C, Sharp SJ, Franks PW, Scott RA, Deloukas P, Forouhi NG, et al. Gene-lifestyle interaction and type 2 diabetes: the EPIC interact case-cohort study. *PLoS medicine* 2014;11(5):e1001647.
- (28) Bao W, Hu FB, Rong S, Rong Y, Bowers K, Schisterman EF, et al. Predicting risk of type 2 diabetes mellitus with genetic risk models on the basis of established genome-wide association markers: a systematic review. *Am J Epidemiol* 2013;178(8):1197-1207.
- (29) Mühlenbruch K, Jeppesen C, Joost H, Boeing H, Schulze MB. The value of genetic information for diabetes risk prediction—differences according to sex, age, family history and obesity. *PLoS One* 2013;8(5):e64307.
- (30) Aguila Y, Vicente BM, Llaguno GA, Sánchez JF, Costa M. Efecto del ejercicio físico en el control metabólico y en factores de riesgo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2: estudio cuasi experimental. *Medwave* 2012;12(10).
- (31) Yengo L, Arredouani A, Marre M, Roussel R, Vaxillaire M, Falchi M, et al. Impact of statistical models on the prediction of type 2 diabetes using non-targeted metabolomics profiling. *Molecular metabolism* 2016;5(10):918-925.
- (32) Watanabe RM. Drugs, diabetes and pharmacogenomics: the road to personalized therapy. *Pharmacogenomics* 2011;12(5):699-701.
- (33) Mihaescu R, Meigs J, Sijbrands E, Janssens AC. Genetic risk profiling for prediction of type 2 diabetes. *PLoS Curr* 2011 Jan 11;3:RRN1208.
- (34) Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications. *Redox biology* 2017;11:637-645.
- (35) Ashcroft FM, Rohm M, Clark A, Brereton MF. Is type 2 diabetes a glycogen storage disease of pancreatic β cells? *Cell metabolism* 2017;26(1):17-23.
- (36) Meng Q, Mäkinen V, Luk H, Yang X. Systems biology approaches and applications in obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. *Current cardiovascular risk reports* 2013;7(1):73-83.
- (37) Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* 2015 Sep;64(9):3135-3145.

- (38) Dutta T, Chai HS, Ward LE, Ghosh A, Persson XM, Ford GC, et al. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes* 2012 May;61(5):1004-1016.
- (39) Aguilera KGC, Sánchez SC. Señales Moleculares que modulan el metabolismo energetico: implicaciones en el desarrollo de obesidad, diabetes y cardiopatías. Mensaje Bioquímico Edit.Facultad de medicina UNAM 2009.
- (40) Tharaheswari M, Reddy NJ, Kumar R, Varshney K, Kannan M, Rani SS. Trigonelline and diosgenin attenuate ER stress, oxidative stress-mediated damage in pancreas and enhance adipose tissue PPAR γ activity in type 2 diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2014;396(1):161-174.
- (41) Halvorsen B, Santilli F, Scholz H, Sahraoui A, Gulseth HL, Wium C, et al. LIGHT/TNFSF14 is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and promotes islet cell dysfunction and endothelial cell inflammation in vitro. *Diabetologia* 2016;59(10):2134-2144.
- (42) Gámiz JLP. La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Revista Española de Cardiología Suplementos* 2007;7(8):12H-19H.
- (43) Zhao W, Rasheed A, Tikkanen E, Lee J, Butterworth AS, Howson JM, et al. Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease. *Nat Genet* 2017;49(10):1450.
- (44) Waldman M, Cohen K, Yadin D, Nudelman V, Gorfil D, Laniado-Schwartzman M, et al. Regulation of diabetic cardiomyopathy by caloric restriction is mediated by intracellular signaling pathways involving 'SIRT1 and PGC-1 α '. *Cardiovascular diabetology* 2018;17(1):111.
- (45) CUSABIO. <https://www.cusabio.com/pathway/AGE-RAGE-signaling-pathway-in-diabetic-complications.html>. Available at: <https://www.cusabio.com/pathway/AGE-RAGE-signaling-pathway-in-diabetic-complications.html>.
- (46) Sirolli V, Rossi C, Di Castelnuovo A, Felaco P, Amoroso L, Zucchelli M, et al. Toward personalized hemodialysis by low molecular weight amino-containing compounds: future perspective of patient metabolic fingerprint. *Blood Transfus* 2012 May;10 Suppl 2:s78-88.
- (47) Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PloS one* 2011;6(2):e16957.
- (48) Barallobre-Barreiro J, Chung Y, Mayr M. La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología* 2013;66(8):657-661.

- (49) Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D608-D617.
- (50) DeHaven CD, Evans AM, Dai H, Lawton KA. Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries. *Journal of cheminformatics* 2010;2(1):9.
- (51) Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013;9(2):280-299.
- (52) Pena MJ, Heinzel A, Rossing P, Parving H, Dallmann G, Rossing K, et al. Serum metabolites predict response to angiotensin II receptor blockers in patients with diabetes mellitus. *Journal of translational medicine* 2016;14(1):203.
- (53) Senn T, Hazen SL, Tang WW. Translating metabolomics to cardiovascular biomarkers. *Prog Cardiovasc Dis* 2012;55(1):70-76.
- (54) McKillop AM, Flatt PR. Emerging applications of metabolomic and genomic profiling in diabetic clinical medicine. *Diabetes Care* 2011 Dec;34(12):2624-2630.
- (55) Kelly AD, Breitkopf SB, Yuan M, Goldsmith J, Spentzos D, Asara JM. Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma. *PloS one* 2011;6(10):e25357.
- (56) Griffin JL, Vidal-Puig A. Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding? *Physiol Genomics* 2008 Jun 12;34(1):1-5.
- (57) Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, Navarro M, Salek RM, Yanes O. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends Anal Chem* 2016 2016/04;78:23-35.
- (58) Tognarelli JM, Dawood M, Shariff MI, Grover VP, Crossey MM, Cox IJ, et al. Magnetic resonance spectroscopy: principles and techniques: lessons for clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology* 2015;5(4):320-328.
- (59) Kumar D, Singh B, Baudh K, Korstad J. Bio-oil and biodiesel as biofuels derived from microalgal oil and their characterization by using instrumental techniques. *Algae and Environmental Sustainability: Springer*; 2015. p. 87-95.
- (60) Wu S, Lv G, Lou R. Applications of chromatography hyphenated techniques in the field of lignin pyrolysis. *Applications of Gas Chromatography: InTech*; 2012.
- (61) Jeong J, Shi X, Zhang X, Kim S, Shen C. Model-based peak alignment of metabolomic profiling from comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 2012;13(1):27.

- (62) wikipedia. Imagen GC-MS. Available at:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer.png#/media/File:Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer.png.
- (63) Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ, Burgess S, Luan J, Tillin T, et al. Genetic predisposition to an impaired metabolism of the branched-chain amino acids and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation analysis. *PLoS medicine* 2016;13(11):e1002179.
- (64) den Ouden H, Pellis L, Rutten GEHM, Geerars-van Vonderen IK, Rubingh CM, van Ommen B, et al. Metabolomic biomarkers for personalised glucose lowering drugs treatment in type 2 diabetes. *Metabolomics* 2016 2016/02;12(2):1-9.
- (65) Nowak C, Salihovic S, Ganna A, Brandmaier S, Tukiainen T, Broeckling CD, et al. Effect of insulin resistance on monounsaturated fatty acid levels: a multi-cohort non-targeted metabolomics and Mendelian randomization study. *PLoS genetics* 2016;12(10):e1006379.
- (66) Liu X, Gao J, Chen J, Wang Z, Shi Q, Man H, et al. Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. *Scientific reports* 2016;6:30785.
- (67) Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol* 2012 Oct;215(1):29-42.
- (68) Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PloS one* 2010;5(12):e15234.
- (69) Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam K, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al. α -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 2010;5(5):e10883.
- (70) Ferrannini E, Natali A, Camastra S, Nannipieri M, Mari A, Adam KP, et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes* 2013 May;62(5):1730-1737.
- (71) Suhre K, Meisinger C, Döring A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C, et al. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PloS one* 2010;5(11):e13953.
- (72) Sarosiek K, Pappan KL, Gandhi AV, Saxena S, Kang CY, McMahon H, et al. Conserved metabolic changes in nondiabetic and type 2 diabetic bariatric surgery patients: global metabolomic pilot study. *Journal of diabetes research* 2016;2016.
- (73) Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17(4):448.

- (74) Bloomgarden Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes* 2018 May;10(5):350-352.
- (75) Yoshizawa F. Effects of leucine and isoleucine on glucose metabolism. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition: Springer*; 2015. p. 63-73.
- (76) Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(10):2467.
- (77) Guasch-Ferre M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 2016 May;39(5):833-846.
- (78) Rasmussen LG, Winning H, Savorani F, Toft H, Larsen TM, Dragsted LO, et al. Assessment of the effect of high or low protein diet on the human urine metabolome as measured by NMR. *Nutrients* 2012;4(2):112-131.
- (79) American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 2009 Jan;32 Suppl 1:S13-61.
- (80) Ramos ERV, Rodríguez NB, Morales B. Frecuencia y factores relacionados con la aparición de cardiopatía isquémica en diabéticos tipo 2. *Multimed* 2015;19(3):1-15.
- (81) Liu X, Gao J, Chen J, Wang Z, Shi Q, Man H, et al. Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. *Scientific reports* 2016;6:30785.
- (82) Van der Kloet F, Tempels F, Ismail N, Van der Heijden R, Kasper P, Rojas-Cherto M, et al. Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics* 2012;8(1):109-119.
- (83) Rhee EP, Clish CB, Wenger J, Roy J, Elmariah S, Pierce KA, et al. Metabolomics of Chronic Kidney Disease Progression: A Case-Control Analysis in the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Am J Nephrol* 2016;43(5):366-374.
- (84) Gilstrap LG, Wang TJ. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. *Clin Chem* 2012 Jan;58(1):72-82.
- (85) Trupp M, Zhu H, Wikoff WR, Baillie RA, Zeng Z, Karp PD, et al. Metabolomics reveals amino acids contribute to variation in response to simvastatin treatment. *PLoS One* 2012;7(7):e38386.
- (86) Van Doorn M, Vogels J, Tas A, Van Hoogdalem EJ, Burggraaf J, Cohen A, et al. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2007;63(5):562-574.

- (87) Dong Y, Chen Y, Yang Y, Shou D, Li C. Urinary Metabolomic Profiling in Zucker Diabetic Fatty Rats with Type 2 Diabetes Mellitus Treated with Glimepiride, Metformin, and Their Combination. *Molecules* 2016;21(11):1446.
- (88) Altmaier E, Fobo G, Heier M, Thorand B, Meisinger C, Romisch-Margl W, et al. Metabolomics approach reveals effects of antihypertensives and lipid-lowering drugs on the human metabolism. *Eur J Epidemiol* 2014 May;29(5):325-336.
- (89) Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World journal of diabetes* 2015;6(13):1246.
- (90) American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 2021;44(Supplement 1):S15-S33.
- (91) Ascaso JF, Real JT, Priego A, Carmena R, Romero P, Valdecabres C. Cuantificación de insulinoresistencia con los valores de insulina basal e índice HOMA en una población no diabética. *Medicina clínica* 2001;117(14):530-533.
- (92) Wanders RJ, Duran M, Loupatty FJ. Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway. *J Inher Metab Dis* 2012;35(1):5-12.
- (93) Cases A. Enfermedad macro y microvascular en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología* 2002;22(5):406-411.
- (94) Holeček M. Histidine in health and disease: Metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients* 2020;12(3):848.
- (95) Koshikawa M, Harada M, Noyama S, Kiyono K, Motoike Y, Nomura Y, et al. Association between inflammation and skeletal muscle proteolysis, skeletal mass and strength in elderly heart failure patients and their prognostic implications. *BMC cardiovascular disorders* 2020;20:1-9.
- (96) Pero RW. Health consequences of catabolic synthesis of hippuric acid in humans. *Current Clinical Pharmacology* 2010;5(1):67-73.
- (97) Hamden K, Bengara A, Amri Z, Elfeki A. Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on key enzymes related to diabetes and hypertension, β -cell and liver function. *Mol Cell Biochem* 2013;381(1):85-94.
- (98) ATSDR.CDC.GOV. Available at:
https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs141.html.
- (99) Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2012 Jul;23(7):1258-1270.

- (100) Shao M, Lu H, Yang M, Liu Y, Yin P, Li G, et al. Serum and urine metabolomics reveal potential biomarkers of T2DM patients with nephropathy. *Annals of Translational Medicine* 2020;8(5).
- (101) Hameed A, Mojsak P, Buczynska A, Suleria HAR, Kretowski A, Ciborowski M. Altered Metabolome of Lipids and Amino Acids Species: A Source of Early Signature Biomarkers of T2DM. *Journal of Clinical Medicine* 2020;9(7):2257.
- (102) Del Coco L, Vergara D, De Matteis S, Mensà E, Sabbatinelli J, Prattichizzo F, et al. NMR-based metabolomic approach tracks potential serum biomarkers of disease progression in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of clinical medicine* 2019;8(5):720.
- (103) Shin AC, Fasshauer M, Filatova N, Grundell LA, Zielinski E, Zhou J, et al. Brain insulin lowers circulating BCAA levels by inducing hepatic BCAA catabolism. *Cell metabolism* 2014;20(5):898-909.
- (104) Shi L, Brunius C, Lehtonen M, Auriola S, Bergdahl IA, Rolandsson O, et al. Plasma metabolites associated with type 2 diabetes in a Swedish population: a case–control study nested in a prospective cohort. *Diabetologia* 2018;61(4):849-861.
- (105) Zhang X, Wang Y, Hao F, Zhou X, Han X, Tang H, et al. Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses. *Journal of proteome research* 2009;8(11):5188-5195.
- (106) Ottosson F, Smith E, Melander O, Fernandez C. Altered asparagine and glutamate homeostasis precede coronary artery disease and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018;103(8):3060-3069.
- (107) Bao Y, Zhao T, Wang X, Qiu Y, Su M, Jia W, et al. Metabonomic variations in the drug-treated type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. *Journal of proteome research* 2009;8(4):1623-1630.
- (108) Yousri NA, Mook-Kanamori DO, Selim MME, Takiddin AH, Al-Homsy H, Al-Mahmoud KA, et al. A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control. *Diabetologia* 2015;58(8):1855-1867.
- (109) Moede T, Leibiger IB, Berggren P. Alpha cell regulation of beta cell function. *Diabetologia* 2020;63(10):2064-2075.
- (110) Huisin MO. Paracrine regulation of insulin secretion. *Diabetologia* 2020;63(10):2057-2063.
- (111) Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren P, Caicedo A. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes* 2014;63(8):2714-2726.

- (112) Hone AJ, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS Lett* 2018;592(7):1045-1062.
- (113) Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013 Feb;62(2):639-648.
- (114) San Miguel-Hernández Á, San Miguel R, Iglesias-García R, Alonso N, Martín-Gil FJ. Utilidad clínica de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), en diferentes patologías: aterosclerosis, hipertensión y enfermedad renal. *Diálisis y Trasplante* 2008;29(1):29-41.
- (115) Van der Kloet F, Tempels F, Ismail N, Van der Heijden R, Kasper P, Rojas-Cherto M, et al. Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics* 2012;8(1):109-119.
- (116) Ripley EM, Clarke GD, Hamidi V, Martinez RA, Settles FD, Solis C, et al. Reduced skeletal muscle phosphocreatine concentration in type 2 diabetic patients: a quantitative image-based phosphorus-31 MR spectroscopy study. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2018;315(2):E229-E239.
- (117) Levelt E, Rodgers CT, Clarke WT, Mahmood M, Ariga R, Francis JM, et al. Cardiac energetics, oxygenation, and perfusion during increased workload in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2016;37(46):3461-3469.
- (118) Wei T, Zhao L, Jia J, Xia H, Du Y, Lin Q, et al. Metabonomic analysis of potential biomarkers and drug targets involved in diabetic nephropathy mice. *Scientific reports* 2015;5:11998.
- (119) Castro L, Tórtora V, Mansilla S, Radi R. Aconitases: Non-redox iron–sulfur proteins sensitive to reactive species. *Acc Chem Res* 2019;52(9):2609-2619.
- (120) Murphy MP, O'Neill LA. Krebs cycle reimagined: the emerging roles of succinate and itaconate as signal transducers. *Cell* 2018;174(4):780-784.
- (121) De Silva GS, Desai K, Darwech M, Naim U, Jin X, Adak S, et al. Circulating serum fatty acid synthase is elevated in patients with diabetes and carotid artery stenosis and is LDL-associated. *Atherosclerosis* 2019;287:38-45.
- (122) Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 2006 Aug;55(8):2277-2285.
- (123) Chen X, Chen X, Tang X. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clin Sci* 2020;134(6):657-676.

- (124) Bowman CE, Wolfgang MJ. Role of the malonyl-CoA synthetase ACSF3 in mitochondrial metabolism. *Advances in biological regulation* 2019;71:34-40.
- (125) Lípidos y diabetes tipo 2. Desarrollo de nuevas terapias basadas en el metabolismo lipídico. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*; 2013.
- (126) Abib A, del Valle EE, Laham G, Spivacow FR. Litiasis renal y riesgo cardiovascular. *Revista de Nefrología, Diálisis y Trasplante* 2019;39(2):126-133.
- (127) Li G, Li Z, Li F, Dong L, Tang L, Xiang J, et al. Meta-analysis on the association of ALDH2 polymorphisms and type 2 diabetic mellitus, diabetic retinopathy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2017;14(2):165.
- (128) Li Y, Li Q, Wang C, Lou Z, Li Q. Trigonelline reduced diabetic nephropathy and insulin resistance in type 2 diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Experimental and therapeutic medicine* 2019;18(2):1331-1337.
- (129) Ma Q, Li Y, Wang M, Tang Z, Wang T, Liu C, et al. Progress in metabonomics of type 2 diabetes mellitus. *Molecules* 2018;23(7):1834.
- (130) Menni C, Fauman E, Erte I, Perry JR, Kastenmuller G, Shin SY, et al. Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach. *Diabetes* 2013 Dec;62(12):4270-4276.
- (131) Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik Y, Lee EJ, et al. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;76(5):674-682.
- (132) Messana I, Forni F, Ferrari F, Rossi C, Giardina B, Zuppi C. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clin Chem* 1998;44(7):1529-1534.
- (133) Yang K, Xu X, Nie L, Xiao T, Guan X, He T, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway. *Toxicol Lett* 2015;234(2):110-119.
- (134) Friedrich N, Skaaby T, Pietzner M, Budde K, Thuesen B, Nauck M, et al. Identification of urine metabolites associated with 5-year changes in biomarkers of glucose homeostasis. *Diabetes Metab* 2018;44(3):261-268.
- (135) Ho JE, Larson MG, Ghorbani A, Cheng S, Chen M, Keyes M, et al. Metabolomic profiles of body mass index in the Framingham Heart Study reveal distinct cardiometabolic phenotypes. *PloS one* 2016;11(2):e0148361.
- (136) Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, Larson MG, Elmariah S, McCabe E, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol* 2013 Jul;24(8):1330-1338.

10. ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado

SITUACIÓN ACTUAL DEL MANEJO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y FACTORES DE RIESGO CARDIOMETABÓLICO ASOCIADOS EN ATENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEPARTAMENTOS DE SALUD 15 Y 18 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO

Introducción

La siguiente información describe el proyecto de investigación "Situación actual del manejo de la Diabetes Mellitus tipo 2 y Factores de Riesgo Cardiometabólico asociados en Atención Primaria de los Departamentos de Salud 15 y 18 de la Comunidad Valenciana", y su papel como participante en el mismo.

Por favor, lea atentamente esta hoja y no dude en preguntar al investigador/facultativo sobre cualquier duda que pueda tener acerca de la información que le presentamos a continuación.

¿Cómo surge este proyecto?

La Diabetes Mellitus es una enfermedad muy importante tanto en número de pacientes que la sufren como en las consecuencias que ésta puede acarrear. Ello supone un gasto económico-sanitario alto.

Explorar qué características de los pacientes condicionan la evolución o la gravedad de las enfermedades y la efectividad de los tratamientos instaurados en ellos hasta el momento permite a los equipos médicos brindar una asistencia sanitaria de mayor calidad, enriquecer la toma de decisiones y contribuir positivamente a la relación con los pacientes.

¿Cuál es su objetivo?

La Diabetes Mellitus es una enfermedad caracterizada por un déficit en la secreción o acción de la insulina, y que produce alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, resultando una hiperglucemia mantenida responsable de complicaciones a nivel retiniano (pudiendo llegar a provocar ceguera), renal (pudiendo llegar a hemodiálisis) y nervioso (pudiendo provocar pérdida de sensibilidad), entre otros.

La Diabetes Mellitus muy frecuentemente también se asocia a obesidad, elevación de lípidos y de la presión arterial. Esta asociación hace del diabético una persona con muy elevado riesgo de desarrollo de complicaciones como amputación de piernas, infartos cerebrales o de corazón.

Teniendo en cuenta el demostrado beneficio de la detección y tratamientos precoces de las complicaciones provocadas por la Diabetes y los factores de riesgo a ella frecuentemente asociados, este estudio se propone conocer el grado de control glucémico y de los factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones de la población con Diabetes Mellitus tipo 2 seguida en Atención Primaria de los Departamentos de Salud 15 y 18 de la Comunidad Valenciana. También pretende evaluar qué medidas de detección precoz de estas lesiones se están aplicando.

¿Cuál es su papel en el estudio?

Se le realizará una entrevista y una exploración antropométrica (Peso, Talla, medición de cintura, toma de presión arterial según normas internacionales). Esto junto con variables analíticas extraídas de controles previos (en el último año) que su médico (previa autorización por su parte mediante la firma del Consentimiento Informado) obtendrá de la revisión de su Historia Clínica será incluido en una base de datos que servirá para conocer los objetivos comentados en el punto anterior.

La duración de la entrevista clínica y exploración será de aproximadamente 15 minutos.

SITUACIÓN ACTUAL DEL MANEJO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO2 Y FACTORES DE RIESGO CARDIOMETABÓLICO ASOCIADOS EN ATENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEPARTAMENTOS DE SALUD 15 Y 18 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Participación voluntaria

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede rehusar participar en el mismo o retirarse de él en cualquier momento sin estar obligado/a a justificar ni explicar su decisión. Ni rechazar ni aceptar participar en este estudio influirá de manera alguna en la atención médica que recibe habitualmente.

Confidencialidad

Sus datos personales y de contacto permanecerán anónimos y serán confidenciales a todos los efectos, no podrán ser divulgados ni develados, por lo que todo el material escrito, impreso y electrónico será codificado y disociado, sólo conocido por el grupo de investigadores, según lo previsto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de "Protección de Datos de Carácter Personal". Los datos originales serán conservados en el Centro Sanitario y sólo tendrán acceso los investigadores del estudio o en caso de Inspección por las Autoridades Sanitarias Españolas.

¿A quién contactar en caso de necesitar más información?

El equipo de investigación responsable de llevar adelante este proyecto podrá responderle todas sus preguntas sobre su papel como participante en el proyecto y sobre otros aspectos relacionados con el mismo.

Facultativo: _____

Teléfono de contacto del centro: _____

SITUACIÓN ACTUAL DEL MANEJO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO2 Y FACTORES DE RIESGO CARDIOMETABÓLICO
ASOCIADOS EN ATENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEPARTAMENTOS DE SALUD 15 Y 18 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

CONSENTIMIENTO INFORMADO AL PACIENTE PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO

He leído y entiendo la Hoja de Información al paciente que se me ha entregado, así como éste Consentimiento Informado. He podido hacer preguntas sobre el estudio y han sido contestadas satisfactoriamente. Acepto voluntariamente participar en este estudio.

	(Fecha) / /
(Firma del paciente)	
	(Fecha) / /
(Firma del investigador)	

ANEXO 2: Hoja de recogida de datos de pacientes

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS METABOLOMICA



Fecha petición: __/__/20__

SIP: _____

Apellidos: _____ Nombre: _____ Edad: ____ Sexo: ____

Antecedentes familiares de diabetes: si/no

Familiar con diabetes: padre/madre/ambos/abuelos/ninguno

HTA: si/no Dislipemia: si/no

Tabaquismo: si-rubio/si-negro/exfumador/no

Fármacos:

Marca	Dosis	Momento de la toma (1-1-1)

PA Clínica	1ª Toma	2ª Toma	3ª Toma	Promedio de tres
PAS (mmHg)				
PAD (mmHg)				
FC (lpm)				

Peso: __kg; Talla: __m; IMC __; Masa Grasa: __%;

Brazo dcho: __; Brazo izq: __; Per. abdominal: __

Eventos CV previos: si/no

ITB	Derecho	Izquierdo
Brazo		
Pedia		
Tibial posterior		
ITB		

MAPA	24h	est 24h	dia	est dia	noche	est noche	Dip (dia-nit x100/dia)
PAS (mmHg)							
PAD (mmHg)							
PAM (mmHg)							
FC (lpm)							



AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Hospital "Verge dels Lliris"

D. Jorge GISBERT BERTRAN, como secretario del Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital "Virgen de los Lirios" de Alcoy.

CERTIFICA:

Que el proyecto de investigación titulado "*CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA EN LA EVOLUCIÓN FISIOPATOLÓGICA HACIA LA DIABETES MELLITUS TIPO 2*", cuyos investigadora principal, dentro de los trabajos de su tesis doctoral, es doña María de los Desamparados Cortés Tormo, Licenciada en farmacia, residente de farmacia con destino en el hospital "Virgen de los Lirios" de Alcoy, fue evaluado favorablemente en la reunión extraordinaria del CEIC de 28 de febrero de 2014.

Y para que conste y surta efecto, se expide el presente certificado en Alcoy, a cuatro de marzo de de dos mil catorce.