

Identificación de marcadores tempranos metabólicos en el desarrollo de daño renal en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mediante la aplicación de la minería de datos usando R

Carlos Daniel Pérez Sánchez¹, Erick Geovanni Galván López¹, Felipe Pérez Vargas², Nicté Figueroa-Vega¹

¹Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato, campus León. 20 de Enero No. 929, Col. Obregón, C.P. 37320. León, Gto., México.

²División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, campus Irapuato-Salamanca. ExHacienda del Copal, C.P. 36500. Guanajuato, Gto.

Palabras clave: Diabetes mellitus, Nefropatía diabética, microalbuminuria, metabólica

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), es una enfermedad crónico-degenerativa causada por un defecto en la captación de la insulina por las células (resistencia a la insulina). Aunado a esto, para el 2014 la prevalencia mundial de la DM2 aumentó hasta un 8.5% con respecto al año 1980 (4.7%)¹. Además, en nuestro país es causante del 9.25% del total de mortalidad registrada². Por otra parte, la DM2 ha sido asociada al incremento en el riesgo de desarrollo de complicaciones³. Las complicaciones microvasculares tienen alta mortalidad y morbilidad en nuestra población, lo que hacen urgentes la búsqueda e investigación de perspectivas novedosas para identificar precozmente el deterioro. A este respecto, de las personas que cursan DM2 cerca del 40% desarrollarán enfermedad renal (Nefropatía Diabética)⁴. Uno de los mecanismos para el desarrollo de la nefropatía diabética (ND) deriva principalmente de la hiperglucemia crónica que es característica de pacientes con DM2 generando cambios funcionales y estructurales en el riñón, tales como: engrosamiento de la membrana basal glomerular, incremento en la formación de la matriz extracelular y pérdida de podocitos con alteración de la tasa de filtración glomerular (TFG), etc^{4,5}. La creatinina sérica y urinaria, la excreción urinaria de albúmina, la depuración de creatinina y la estimación de la filtración glomerular son frecuentemente empleadas en el laboratorio clínico de rutina para evaluar la función renal; sin embargo, es conocido que estas pruebas presentan desventajas que limitan su sensibilidad clínica en estadios tempranos, indicando la importancia de acciones preventivas y de diagnóstico oportuno para ofrecer mejor calidad de vida a los pacientes, por lo que la ND se detecta hasta etapas avanzadas cuando el beneficio del tratamiento es limitado. Debido a lo anterior, son necesarios marcadores oportunos de tamizaje de la DM para evitar la progresión a ND a estadios avanzados, así como la implementación de un tratamiento adecuado. Con respecto a lo anterior, se han establecido nuevas estrategias analíticas como la metabólica, la cual ha surgido como una herramienta que puede tener un gran impacto clínico en la salud, ya que a partir de un simple análisis y un costo relativamente bajo permite la identificación de metabolitos que pueden ser característicos del fenotipo de una enfermedad. En este contexto, con el desarrollo de la metabólica, se ha comenzado a estudiar la huella química generada en diferentes enfermedades para la identificación de nuevos biomarcadores de daño temprano⁶⁻⁸, por lo que se ha propuesto el uso de esta herramienta con el fin de identificar biomarcadores que aporten un valor predictivo desde las primeras etapas y de esta manera lograr un diagnóstico oportuno y no invasivo de la enfermedad.

Objetivo

Identificar biomarcadores metabólicos en personas diagnosticadas con DM2 que puedan servir como método de tamizaje para evitar la progresión de la ND a estadios avanzados.

Selección de los pacientes

Se incluyeron pacientes de con una edad de 20-50 años, diagnosticados con DM2 sin daño renal (n=19), con DM2 y daño renal (n=9) y sujetos clínicamente sanos (n=21), a los cuales se les registraron datos antropométricos (Talla, Peso, IMC, entre otros) e historia clínica. Se tomó una muestra de orina y de sangre por la mañana con un ayuno de 8 horas.

Se obtuvo el plasma mediante centrifugación de las muestras sanguíneas para la determinación de glucosa, hemoglobina glucosilada mediante métodos espectrofotométricos. Por otro lado, en la muestra de orina fue determinada la creatinina, TFG. El análisis del perfil metabólico en orina se realizó mediante una Nariz Electrónica (Alpha MOS HERACLES Flash Gas Chromatography Electronic Nose) bajo las siguientes condiciones: Volumen de inyección: 500 μ l, Temperatura de inyector: 200°C, Flujo constante de hidrógeno de 1 mL/min y temperatura del horno: 50°C, 30 segundos, aumentando 10°C/segundos, hasta alcanzar una temperatura máxima de 280°C. Posteriormente, se determinó la identidad de los metabolitos con base a los índices de Kovats generados por el software del equipo, y con los datos obtenidos: tiempo de retención (TR) y Área Bajo la Curva (AUC) se realizaron análisis estadísticos multivariados: Análisis de Componentes Principales (PCA) y Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) en el programa R.

Resultados

Las características de los voluntarios son mostradas en la Tabla 1.

Variable	Sujetos sanos	Pacientes con DM sin DR	Pacientes con DM y DR	f	P value
Edad	52.67 \pm 12.55	49.42 \pm 7.21	48.78 \pm 48.78	0.76	0.474
Peso	58.14 \pm 9.03	73.36 \pm 13.13	75.69 \pm 75.69	12.03	6.29E-05
Altura	1.52 \pm 0.08	1.59 \pm 0.1	1.58 \pm 1.58	2.73	0.0756
IMC	25 \pm 2.49	29.17 \pm 4.97	30.44 \pm 30.44	8.76	0.000598
Grasa	34.14 \pm 7.89	35.83 \pm 7.1	37.73 \pm 37.73	0.71	0.498
Masa.muscular	41.18 \pm 3.3	44.13 \pm 9.01	44.42 \pm 44.42	1.17	0.32
Cintura	86.08 \pm 6.42	94.86 \pm 10.15	99.94 \pm 99.94	10.21	0.000214
Cadera	95.02 \pm 6.47	104.02 \pm 8.21	106.8 \pm 106.8	10.8	0.000142
Cuello	35.16 \pm 1.75	36.52 \pm 3.63	37.74 \pm 37.74	2.8	0.0713
TAS	130.38 \pm 24.59	116.63 \pm 7.43	115.33 \pm 115.33	3.84	0.0287
TAD	78.33 \pm 12.22	75.89 \pm 7.01	80 \pm 80	0.61	0.55
TA	95.69 \pm 15.34	88.18 \pm 8.98	91.78 \pm 91.78	1.88	0.164
Sarcopenia	26.44 \pm 6.25	26.26 \pm 27.83	25.22 \pm 25.22	0.01	0.991
Tiempo.desde.dx	NA	3.69 \pm 3.46	3.86 \pm 3.86	12.84	3.72E-05
Glu	109.24 \pm 24.99	133.63 \pm 50.55	232.56 \pm 232.56	13.49	2.45E-05
HbA1c....	6.1 \pm 0.68	7.09 \pm 1.8	7.64 \pm 7.64	4.4	0.0178
Col	171.82 \pm 20.48	189 \pm 41.64	213.89 \pm 213.89	6.45	0.0034
HDL	40.02 \pm 7.97	45.95 \pm 13.64	37.11 \pm 37.11	2.83	0.0695
no.HDL	134.07 \pm 22.13	143.05 \pm 43.83	176.78 \pm 176.78	5.96	0.00499
LDL	120.28 \pm 21.08	115.23 \pm 38.11	133.29 \pm 133.29	1.23	0.301
VLDL	9.22 \pm 11.71	27.82 \pm 17.85	43.49 \pm 43.49	18.68	1.15E-06
TG	162.86 \pm 82.31	139.11 \pm 89.25	217.44 \pm 217.44	2.7	0.0778
Creat	0.79 \pm 0.13	0.89 \pm 0.22	0.92 \pm 0.92	2.16	0.126
eTFG	92.81 \pm 17.95	81.12 \pm 17.33	81.73 \pm 81.73	2.31	0.111
U.Creat	2.43 \pm 1.55	1.84 \pm 0.72	2.63 \pm 2.63	1.76	0.183

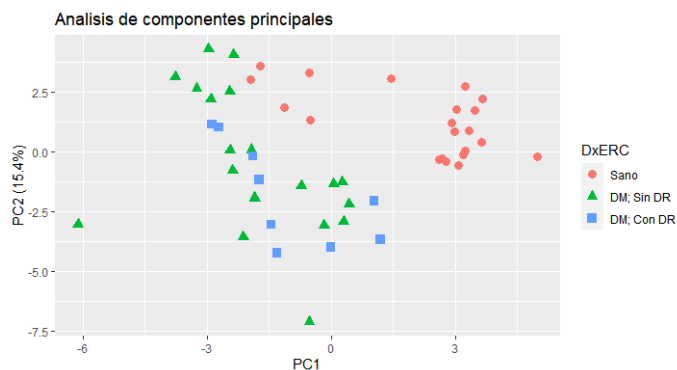
<i>Creat.horaria</i>	0.03±0.04	0.04±0.02	0.08±0.08	4.82	0.0125
<i>Microalb</i>	25.73±15.81	10.79±6.78	34.44±34.44	13.01	3.32E-05
<i>Indice</i>	1.91±2.13	0.32±0.2	0.67±0.67	6.69	0.00281
<i>IMT</i>	0.53±0.01	0.52±0.05	0.53±0.53	0.35	0.704
<i>Propenal</i>	73.8±145.1	5090.53±16058.13	296.48±296.48	1.41	0.254
<i>X2.propanol</i>	593.28±1262.77	3317.38±3634.45	1718.26±1718.26	5.81	0.00564
<i>butane.2.3..dione.</i>	179.23±68.12	410.78±443.37	297.73±297.73	3.27	0.0469
<i>X1.Propanol..2.methyl..</i>	38.78±91.08	207.64±180.23	161.97±161.97	7.18	0.00193
<i>X1.2.Dichloroethane</i>	14.05±35.71	115.52±227.27	49.99±49.99	2.45	0.0974
<i>Methyl.isobutyrate</i>	276.4±268.92	171.05±107.05	382.24±382.24	2.14	0.129
<i>X2.Methylbutane.1.1.79.2</i>	39.12±74.43	157.65±74.22	117.62±117.62	11.42	9.40E-05
<i>X2.Methylbutane.1.2.92.2</i>	42.7±58	1736.91±6383.96	804.6±804.6	0.86	0.431
<i>X2.methylpropanal</i>	261.29±665.17	1210.43±987.34	857.06±857.06	5.83	0.00553
<i>butane.2.3.dione</i>	368.52±316.28	649.99±271.65	516.47±516.47	4.22	0.0208
<i>Methyl.isobutyrate.1</i>	42.92±90.04	155.16±137.81	126.87±126.87	4.68	0.0142
<i>X2.4.dimethyl.1.3.dioxane</i>	57.31±94.84	142.41±127.34	84.07±84.07	3.07	0.0561

Tabla 1. Diabetes y daño renal. Los valores expresan la medias ± la desviación estandar. Se compararon los 3 grupos mediante un analisis de ANOVA. Los metabolitos con con una significancia de $p < 0.05$ que se encontraron fueron x2.propanol, butane.2.3.dione, x1.propanol.2.methyl, X2.methylbutane, x2.methylpropanal, butane.2.3.dione, methyl.isoburate.1.

Con una prueba de Tuckey se observo los siguientes metabolitos muestran una diferencia significativa entre los grupos de DM con DR y Dm sin DR: Propenal, x2.propanol, methyl.isobutyrate, x2.4 dimethyl.1.3.dioxane

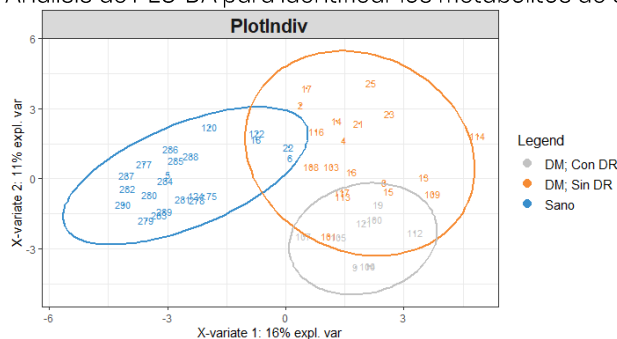
Mediante el análisis PCA se observó una separación entre el grupo de pacientes con DM y sujetos sanos, explicando el 31.6% de la variabilidad de los datos (Figura 1).

Figura 1. Análisis de componentes principales en el grupo de estudio.



Por otro lado, el PLS-DA mostró que los 3 grupos (Sanos, DM2 con y sin daño renal) pueden distinguirse claramente, explicando el 27% de su variabilidad (Figura 2).

Figura 2. Análisis de PLS-DA para identificar los metabolitos de daño renal.



Además, se logró identificar al propenal, 2-metilpropanal, 2-propanol, alcohol propílico, metil-isobutirato, 2-metilbutano y butan-2,3-diona como los metabolitos más relevantes que distinguía al grupo de los pacientes con DM2 y daño renal con respecto al grupo de sujetos sanos, 3 de ellos (2-propanol, alcohol propílico y butan-2,3-diona) se encontraban involucrados en vías metabólicas como: metabolismo de butanoato, metabolismo de glicerolípidos y metabolismo del propanoato.

Discusión

De acuerdo con los datos obtenidos, el propenal, 2-metilpropanal, 2-propanol, alcohol propílico, metil-isobutirato, 2-metilbutano y butan-2,3-diona se encuentran asociados a vías metabólicas como: metabolismo de glicerolípidos, metabolismo del propanoato y metabolismo del butanoato, respectivamente. El alcohol propílico se genera a partir del glicerol, que es el principal producto de degradación de los triacilglicéridos (TAGs). A este respecto, la diabetes mellitus se caracteriza por una deposición de lípidos que lleva a una excesiva e incompleta degradación de éstos⁹, por lo que este proceso puede llevar a la acumulación del alcohol propílico en la orina. Resultados similares fueron mostrados por Van y col. (2012), encontrando metabolitos que pertenecían al grupo de acilcarnitinas y acilglinas que se asocian al metabolismo de glicerolípidos¹⁰

Por otro lado, en la DM2 la glucólisis se encuentra casi inactiva y el organismo recurre a la producción de energía a partir de la activación de otras vías. Por ejemplo, a partir del metabolismo del propanoato y el metabolismo del butanoato, generando la acumulación de cetoácidos con la subsecuente generación de 2-propanol derivado de acetona en el metabolismo del propanoato y la producción de diacetil de manera indirecta durante el metabolismo del butanoato. Algunos estudios han mostrado que en pacientes con ND se encuentran metabolitos como: 3-hidroxiacetato y el ácido 3-metiladípico que se participan en el metabolismo del propanoato y metabolismo de ácidos grasos, respectivamente¹¹

Además, en nuestro estudio se encontraron otros metabolitos como: propenal, también llamado acroleína, producto de peroxidación lipídica, y asociado con la DM2 y ND^{13,14}. De la misma manera, se detectó el 2-metil propenal (isobutaraldehído) el cual se encuentra incrementado en pacientes diabéticos¹⁵. Asimismo, el metil isobutirato estuvo incrementado en el grupo de DM2, el cual es un metabolito que participa en la producción de glucosa a partir de aminoácidos no glucosídicos (Gluconeogénesis)¹⁶. Finalmente, el metil-butano también se detectó y puede explicarse como un posible producto de peroxidación lipídica, sin embargo, no hay suficientes estudios que sustenten esta hipótesis.

Finalmente, algunos de estos metabolitos se han reportado presentes en la enfermedad renal; por ejemplo, el propenal se ha encontrado presente en pacientes con enfermedad renal, por lo tanto, este estudio abre una ventana importante para poder detectar y determinar este tipo de metabolitos en esta enfermedad y realizar una metabolómica dirigida.

Este estudio logró identificar metabolitos que se encuentran asociados con DM2 con enfermedad renal, y de manera más importante la identificación de vías metabólicas que están siendo alteradas.

Bibliografía

1. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, e442 (2006).
2. GBD Compare | IHME Viz Hub. Available at: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. (Accessed: 18th March 2018)
3. OMS | Diabetes. *WHO* (2017).
4. General, H. & Gonz, M. G. Nefropatía diabética. **5**, (2002).
5. Fundación Mexicana del Riñón A.C. Available at: <http://www.fundrenal.org.mx/erc.html>. (Accessed: 18th March 2018)
6. Hocher, B. & Adamski, J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 269–284 (2017).
7. Bouatra, S. *et al.* The Human Urine Metabolome. *PLoS One* **8**, (2013).
8. Su, L. J. *et al.* The Use of Metabolomics in Population-Based Research. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **5**, 785–788 (2014).
9. Mihalik, S. J. Increased Levels of Plasma Acylcarnitines in Obesity and Type 2 Diabetes and Identification of a Marker of Glucolipotoxicity. **18**, 1695–1700 (2010).
10. van der Kloet, F. M. *et al.* Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics* **8**, 109–119 (2012).
11. Sharma, K. *et al.* Metabolomics Reveals Signature of Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1901–1912 (2013).
12. Pena, M. J. *et al.* Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **31**, 1138–1147 (2014).
13. Zhang, J. *et al.* Metabonomics research of diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus based on UPLC–oaTOF–MS system. *Anal. Chim. Acta* **650**, 16–22 (2009).
14. Zhu, C., Liang, Q. L., Hu, P., Wang, Y. M. & Luo, G. A. Phospholipidomic identification of potential plasma biomarkers associated with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Talanta* **85**, 1711–1720 (2011).
15. Shokry, E., de Oliveira, A. E., Avelino, M. A. G., de Deus, M. M. & Filho, N. R. A. Earwax: A neglected body secretion or a step ahead in clinical diagnosis? A pilot study. *J. Proteomics* **159**, 92–101 (2017).
16. Willems, E. *et al.* Embryonic Protein Undernutrition by Albumen Removal Programs the Hepatic Amino Acid and Glucose Metabolism during the Perinatal Period in an Avian Model. *PLoS One* **9**, (2014).