



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Metabolómica dirigida para evaluación del perfil de acilcarnitinas en etapas tempranas de la gestación en mujeres que desarrollan diabetes gestacional.

Acylcarnitine profile assessment in early pregnancy stages of women with gestational diabetes using a targeted metabolomic approach.

Razo-Azamar, Brenda Melissa^{1*}.

1. Unidad de Vinculación Científica Facultad de Medicina UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

*Correspondencia: INMEGEN. Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, C.P. 14610, CDMX, México.
Tel. +52(55)3957 9402, melraz81@gmail.com

Resumen

La diabetes gestacional representa la principal alteración metabólica durante el embarazo, afectando al 17.7% de los embarazos en México. La importancia clínica de esta patología radica en las complicaciones a corto y largo plazo que afectan a la madre y al producto como lo son el desarrollo de diabetes, obesidad, hipertensión y síndrome metabólico. La diabetes gestacional se diagnostica entre la semana 24 a 28 de gestación mediante la realización de una curva de tolerancia a la glucosa. Recientemente, gracias al estudio de la metabolómica se han descubierto diversos biomarcadores que han permitido un mejor entendimiento de las vías metabólicas y metabolitos que derivan en el desarrollo de la diabetes gestacional y que pueden ayudar a desarrollar técnicas y herramientas para el diagnóstico temprano de esta patología en etapas tempranas de la gestación. La metabolómica dirigida ofrece una ventaja para la evaluación y análisis enfocados a preguntas específicas y particulares para evaluar de una manera más eficaz perfiles bioquímicos y moleculares en estados patológicos y no patológicos. Evaluar el perfil de acilcarnitinas en etapas de la gestación en mujeres que desarrollan diabetes gestacional, empleando un enfoque metabolómico dirigido aporta la posibilidad de evaluar e identificar aquellos potenciales biomarcadores clave en el desarrollo de esta

Abstract

Gestational diabetes represents the main metabolic alteration during pregnancy affecting around 17% of pregnancies in Mexico. The clinical relevance of this pathology is the short and long term complications such as: obesity, diabetes, and hypertension; that affect mother and child. Gestational diabetes is often diagnosed between weeks 24 to 28 of gestation through an oral glucose tolerance test. Recently, diverse metabolomic approaches have unveiled a variety of biomarkers that have been key to a better knowledge of impaired metabolic pathways and metabolites that play a role on the onset and development of gestational diabetes; allowing new techniques and diagnostic tools to emerge in order to assess the development of this pathology on early pregnant states. Targeted metabolomics offers a great advantage in the assessment and analysis of metabolic profiles on healthy and pathological states focused on particular and specific questions. In particular, the assessment of the acylcarnitine profile on early pregnancy stages in women who will develop gestational diabetes using a targeted metabolomics approach gives the possibility to evaluate and identify potential metabolic biomarkers key on the development of this pathology. It also gives the opportunity to establish and analyze the correlation between acylcarnitines,

patología y su relación con alteraciones en la oxidación de ácidos grasos, aminoácidos, así como la resistencia a la insulina.

Palabras claves: metabolómica, metabolómica dirigida, espectrometría de masas, acilcarnitinas, diabetes gestacional

Keywords: metabolomics, targeted metabolomics, mass spectrometry, acycarnitines, gestational diabetes

Introducción

La metabolómica se puede definir como la rama de las ciencias ómicas centrada en el estudio de metabolitos (tanto endógenos como exógenos) presentes en sistemas biológicos con el objetivo de proveer información comparativa ya sea cuantitativa o semi-cuantitativa sobre los metabolitos presentes en dichos sistemas (1). Un metabolito se define como cualquier compuesto orgánico de temporalidad variable de bajo peso molecular (aproximadamente entre 50-1,500 Da) y que está involucrado en procesos biológicos (generalmente involucrado en rutas metabólicas ya sea como sustrato y/o producto) (2). Al conjunto de metabolitos presentes en una célula, tejido o muestra biológica en un tiempo determinado se le denomina metaboloma (conjunto de reacciones anabólicas y/o catabólicas) (1, 2). Por lo tanto, el estudiar el metaboloma provee un panorama del fenotipo característico de un sistema biológico. El metaboloma permite entender las interacciones río debajo de los procesos transcriptómicos y proteómicos y por ende se considera como una ciencia ómica complementaria que mejor modula y representa el fenotipo molecular en la salud y la enfermedad en cualquier punto en el tiempo (3).

La ventaja del estudio de la metabolómica sobre otras ciencias ómicas (como la genómica) es su gran habilidad para evaluar y elucidar el efecto de diversos factores genéticos y ambientales, para obtener un perfil sobre condiciones fisiopatológicas en un punto de tiempo específico (4, 5). Debido a que el metaboloma desempeña un papel importante en las funciones celulares en los organismos, surge la necesidad de tener un mejor entendimiento para elucidar sus funciones específicas y el rol que desempeña en la fisiopatología de enfermedades de interés (2). Esto se logra a través del abordaje e implementación de diversas técnicas de metabolómica para la identificación de aquellos metabolitos y rutas metabólicas que se ven alteradas o juegan un papel importante en fenotipos particulares y posteriormente integrar los resultados obtenidos empleando estudios biológicos funcionales y/o mecanísticos.

Las principales técnicas empleadas para la identificación y evaluación de metabolitos se enfocan principalmente en obtener enfoques generales (metabolómica no dirigida, la cual permite evaluar el perfil metabolómico global) y particulares (metabolómica dirigida, la cual determina el perfil metabolómico cuando se tienen conocimientos y preguntas específicas a priori sobre una condición) empleando técnicas de espectrometría de masas (2).

Espectrometría de masas en metabolómica

La espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés mass spectrometry) consiste en una técnica y plataforma óptima para análisis de metabolómica debido a que provee una alta versatilidad, reproducibilidad y sensibilidad para la determinación de metabolitos de interés (6, 7). Esta información se obtiene bajo el fundamento de medir la relación masa/carga (m/z) de los iones que se forman posterior a un proceso de ionización (en donde se induce un cambio en la pérdida o ganancia de especies neutras) (7). La muestra que se introduce en un espectrómetro de masas (la cual comprende una mezcla compleja de metabolitos a analizar) puede ser introducida al equipo de MS de manera directa o empleando técnicas de separación previas (ya sea empleando técnicas de cromatografía líquida o de gases) (8). Una inyección directa de la muestra es el método de preferencia para estudios de metabolómica de alta resolución pues este tipo de estudios busca evaluar y analizar la totalidad del metaboloma (metabolómica no dirigida). Sin embargo, debido a que miles de iones pueden encontrarse presentes en la muestra, una separación previa mediante métodos cromatográficos ayuda a lograr una mejor identificación de metabolitos antes de que éstos sean analizados por técnicas de MS. Esto es debido a que este proceso previo minimiza supresión de señal al momento de ser detectadas por el MS; logrando así una mayor sensibilidad para identificar al metabolito (generando un tiempo de retención específico lo más acercado a lo fisiológico). Por lo tanto, la espectrometría de masas identifica a cada metabolito con base en su relación m/z , su tiempo de retención (en MS) y el patrón de fragmentación (en espectrometría de masas en tándem MS/MS) (9).

En general, un equipo de espectrometría de masas se conforma por cinco módulos:

1) *un sistema de introducción de la muestra a analizar* (puede ser directo o empleando métodos cromatográficos) (7, 9).

2) *una fuente de ionización* (cuya función principal es aplicar energía a la muestra con la finalidad de obtener iones con carga positiva o negativa). El tipo de fuente de ionización va a depender de las propiedades de los metabolitos a analizar (polaridad, peso molecular y volatilidad). Existen dos tipos de técnicas de ionización que se pueden emplear para generar estos iones: la ionización suave en donde la energía que se imparte sobre la molécula hace que únicamente adquieran carga formando así iones moleculares (ionización química, ionización por electrospray, ionización por bombardeo rápido de átomos y ionización-desorción asistida por láser) y técnicas de ionización fuerte en donde la energía que se imparte sobre la molécula es de una magnitud mayor, rompiendo así la molécula y formando productos o fragmentos iónicos (ionización por impacto de electrones) (7).

3) *un analizador de masas* cuya función es separar y ordenar los iones con base en su relación m/z. Dependiendo del tipo de analizador que se emplee, el intervalo tanto de m/z así como su precisión y exactitud puede variar. Por ejemplo, si se emplea un analizador de tipo cuadrupolo (Q) el intervalo de masa oscila entre 2-2,000Da y una exactitud de entre 100-1,000 ppm; mientras que si se emplea un analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) el intervalo de

masa a detectar oscila entre 10,000 y 20,000Da con una exactitud de 10-100 ppm (9).

4) *un detector* el cual amplifica y registra la señal que proviene del analizador de masas para posteriormente enviarla al procesador de datos. Algunos de los detectores mayormente empleados son el fotomultiplicador y el electromultiplicador (9)

5) *un procesador* de los datos obtenidos, que registra la información obtenida en forma de espectro de masa (el cual genera una representación gráfica de todos los iones detectados en la muestra separados con base en su relación m/z y ajustado también al porcentaje de las especies de iones más abundantes en dicha muestra (9).

En un equipo de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) la diferencia radica en el empleo de dos analizadores de masas acoplados; obteniendo entonces siete módulos: 1) sistema de inducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas 1 (MS1), 4) celda de colisión, 5) analizador de masas 2 (MS2), 6) detector y 7) procesador de datos (2, 9).

La ventaja de emplear espectrometría de masas radica en que se trata de una técnica que es adaptable a las necesidades de la muestra a analizar; es decir, dependiendo del tipo de analito y del intervalo de masa y la exactitud que se desee, se pueden modificar las condiciones de la fuente de ionización y del analizador de masas (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Tipos de fuente de ionización empleados en MS

Fuente de ionización	Tipo de metabolito/analito	Tipo de ionización	Modo de ionización
Ionización por impacto de electrones (electron impact, EI)	Metabolitos pequeños: aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos (analitos volátiles)	Fuerte	Se aplica energía eléctrica (aprox. 70eV, electrovolts)
Ionización química (Chemical Ionisation, CI)	Compuestos orgánicos: alcoholes, gases metano, butano (analitos volátiles)	Suave	Se aplica energía eléctrica simultáneamente en colisión con gas (amonio, metano)
Ionización por electrospray (Electro Spray Ionisation, ESI)	Acilcarnitinas, aminoácidos, esteroides, vitaminas (analitos no volátiles)	Suave	Se aplica energía eléctrica
Ionización-desorción asistida por láser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI)	Nucleótidos, péptidos, proteínas	Suave	Se aplica energía empleando rayo láser
Ionización por bombardeo rápido de átomos (Fast Atom Bombardment, FAB)	Péptidos, carbohidratos, organometales	Suave	Bombardeo empleando un gas inerte

Tabla 2. Tipos de analizadores de masas empleados en MS

Tipo de analizador de masas	Intervalo de masa (Da)	Exactitud (PPM)
Cuadrupolo (Quadrupole, Q)	2-2,000	100-1,000
Tiempo de vuelo (Time of Flight, TOF)	10,000-20,000	10-100
Orbitrap	30,000-60,000	0.1-1
Transformada de Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance FTICR)	100,000- 1x10 ⁶	0.1-1

Espectrometría de masas en metabolómica dirigida

El principal objetivo de los análisis de metabolómica dirigida es analizar y cuantificar aquellos metabolitos que ya se tienen predefinidos. Para este caso particular, es necesario preparar una curva estándar con los rangos de las concentraciones de los metabolitos de interés con la finalidad de obtener datos cuantitativos. Este tipo de análisis se emplea para conocer con exactitud las concentraciones de metabolitos en una muestra biológica, así como paso adicional en la validación en análisis de metabolómica no dirigida. Al emplear técnicas de espectrometría de masas acopladas a diversas técnicas de separación previas para estudios de metabolómica dirigida se provee una mayor selectividad, precisión y sensibilidad en comparación con estudios de metabolómica no dirigida.

Métodos bioinformáticos empleados en el análisis metabolómicos

Una vez obtenidos los datos en estudios de metabolómica (dirigida o no dirigida) provenientes ya sea de técnicas acopladas a espectrometría de masas (MS) o de resonancia magnética nuclear (NMR), uno de los retos es extraer esta información, analizarla e integrarla. Primero se deben de normalizar los datos con la finalidad de remover las posibles diferencias en concentración en los metabolitos que se analizaron. Este proceso logra que tanto a las concentraciones altas o bajas en la muestra se le den el mismo peso en análisis estadísticos subsecuentes. Para determinar y analizar diferencias entre grupos experimentales existen dos posibilidades de análisis estadísticos cuando se trabaja con datos de metabolómica: análisis univariado (cuando se evalúan diferencias empleando una variable de respuesta a analizar) y análisis multivariado (evaluar diferencias empleando más de una variable de respuesta a analizar). Así mismo, se pueden vincular los datos metabolómicos en relación con otras ciencias ómicas; ya sea para mapeo de rutas metabólicas y/o modelado de redes (generalmente empleando bases de datos como KEGG, BIOCYC, BiGG Models). Actualmente se cuenta con diversas plataformas en línea (Tabla 3) (10–14) y basadas en

lenguaje R para generar análisis estadísticos en metabolómica.

Metabolómica y diabetes gestacional

Los estudios de metabolómica proveen una ventana para evaluar los mecanismos fisiopatológicos de diversas patologías como lo son la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (15). Estudios de metabolómica han correlacionado diversos metabolitos con el desarrollo de diabetes tipo 2 hasta 12 años antes del establecimiento de esta patología (16, 17), dentro de los cuales se incluyen: hidratos de carbono, especies de lípidos como lisofosfatidilcolinas, ácidos grasos, acilcarnitinas (Acs) y aminoácidos, en especial aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs por sus siglas en inglés, leucina, valina e isoleucina) y aromáticos (fenilalanina y tirosina) (16–19). El perfil de las distintas especies de ACs, así como sus concentraciones, puede caracterizar el patrón metabólico y puede indicar la presencia de alteraciones en la oxidación de ácidos grasos y en el metabolismo de los ácidos orgánicos (20). En contraste con las ACs de cadena corta (C2-C5), las cuales pueden derivarse de la degradación de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos; las ACs de cadena media (C6-C12) y larga (C14-C26) se derivan exclusivamente del metabolismo de los ácidos grasos. Las ACs de cadena larga principalmente se sintetizan y se metabolizan en la mitocondria, por lo tanto, concentraciones de estas especies de ACs son usadas como marcadores de alteración en la oxidación de ácidos grasos (21, 22).

Las mujeres que desarrollan diabetes gestacional se caracterizan por presentar concentraciones de acilcarnitinas de cadena corta elevadas en el primer trimestre del embarazo. Diversos estudios han evaluado el papel de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs por sus siglas en inglés) y sus metabolitos en la resistencia a la insulina y la progresión a diabetes tipo 2 (23), así como la progresión de diabetes gestacional al desarrollo de diabetes tipo 2 post-parto a largo plazo (15, 24). Un estudio de casos y controles reciente (25) encontró elevación en las concentraciones de Val y Leu así

como de sus acilcarnitinas AC3 (propionilcarnitina), AC4 (butilcarnitina), IsoC4 y C5 (isovalerilcarnitina); en las mujeres que desarrollan diabetes gestacional en comparación con el grupo que no desarrolla esta patología. Por otro lado, se ha demostrado que las acilcarnitinas de cadena media; en especial AC6 (hexanoilcarnitina) y AC8 (octonoilcarnitina) se encuentran elevadas en los casos de mujeres con diabetes gestacional y que a largo plazo desarrollarán diabetes tipo 2 (26). Estas dos especies de acilcarnitinas (AC6, AC8) han sido asociadas al desarrollo y disfunción de la célula β pancreática, reflejada por alteración en la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa (26).

Tabla 3. Plataformas en línea empleadas en el análisis en estudios de metabolómica

Herramienta estadística	MetaboAnalyst 5.0 (10)	XCMS Online (11)	NOREVA (12)	3Omics (13)	W4M (14)
Procesamiento de datos de espectro crudos					
Optimización de parámetros	+++	+	-	-	++
Anotación de compuestos	+	+++	-	-	++
Algoritmos de soporte variados	+++	++	-	-	++
Resumen del análisis	+++	-	-	-	+
Análisis estadístico					
Univariado	+++	+	+	-	+
Multivariado	+++	+	++	-	+++
Generación de clústers	+++	+	-	-	+
Análisis de poder estadístico	+	-	-	-	-
Análisis serie de tiempo	+	-	+	-	-
Análisis de biomarcador	+	-	-	-	-
Meta-análisis de biomarcador	+	-	-	-	-
Análisis funcionales					
Análisis de función (empleando picos de MS)	+++	++	-	-	-
Análisis de enriquecimiento (compuestos)	+++	-	-	++	-
Análisis de vías	+++	-	-	++	-
Meta-análisis funcional	+++	++	-	-	-
Análisis de integración					
Análisis de unión de vías no supervisado	+++	-	-	+++	-
Redes basadas en validaciones previas	++	-	-	++	-
Redes basadas en correlaciones	++	-	-	-	-
Otras opciones de análisis					
Normalización de datos	++	-	+++	-	+
Estimación de datos faltantes	+	-	+	-	-
Fusión de replicados técnicos	+	-	-	-	-

Nota: “+” significa que el software incluye el análisis y la cantidad de “+” indica la calidad y el soporte que se tiene para la realización del análisis; “-” significa que el software no incluye el análisis.

Una característica principal de la diabetes gestacional es la resistencia a la insulina acompañada por hiperlipidemia (principalmente por incremento de concentración de ácidos grasos), en donde Metzger (27) observó que en el tercer trimestre de gestación, las mujeres con diabetes gestacional presentaban mayores concentraciones de ácidos grasos libres en ayuno, sugiriendo que la resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos ocasionaba el fenotipo observado en

esas pacientes. Por lo tanto, alteración en el metabolismo de ácidos grasos, como lo observado por Metzger et al., puede constituir un evento temprano que desencadena la patología de diabetes gestacional como lo sugieren las diferencias observadas de concentración de acilcarnitinas, en donde, el grupo con diabetes gestacional presenta elevación de todas las acilcarnitinas de cadena corta, media y larga.

La glucosa es el sustrato con preferencia para la obtención de energía, pero cuando existen condiciones en donde este sustrato no está disponible para la generación de energía, como lo es en el caso de resistencia a la insulina, la célula emplea ácidos grasos libres y aminoácidos como sustratos alternativos, desencadenando una alteración en el balance entre las acilcarnitinas (oxidación de ácidos grasos y/o aminoácidos) y los aminoácidos (28). Estos cambios en las rutas metabólicas que conllevan

a la acumulación de metabolitos intermediarios como lo son las acilcarnitinas, pudieran interferir con la sensibilidad a la insulina, ocasionando el desarrollo de resistencia a la insulina e incluso diabetes. Sin embargo, no está del todo claro si las concentraciones elevadas de acilcarnitinas y/o de BCAAs causan resistencia a la insulina o si son el reflejo de ésta (22, 29).

Materiales y reactivos

<i>Materiales biológicos</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Equipos</i>	<i>Softwares</i>
Suero obtenido de mujer embarazada	<i>NeoBase Non-derivatized MS/MS Kit, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA</i>	Tubo BD <i>Vacutainer</i> tapón rojo con activador de coagulación	<i>MassLynx</i>
		Aguja BD <i>Vacutainer PrecisionGlide</i> 21Gx38mm	<i>MetaboAnalyst 5.0</i>
		BD <i>Vacutainer one-use holder</i>	
		Centrífuga	
		Papel filtro Whatman 903, Dassel, Germany	
		<i>Quattro Micro API tandem MS, Waters Inc., Milford, MA, USA</i>	
		Tubo BD <i>Vacutainer</i> tapón rojo con activador de coagulación	

Perfil de acilcarnitinas empleando HPLC-MS/MS (metabolómica dirigida)

ambiente a 1,5000 rpm por 15 minutos para la obtención de suero.

Procedimiento (Esquema)

Metabolómica dirigida: para la obtención del perfil metabolómico (carnitina libre, 38 acilcarnitinas y 11 aminoácidos) se emplea el kit *NeoBase Non-derivatized MS/MS de PerkinElmer*.

Obtención de suero:

1. Se obtiene muestra de sangre venosa (paciente con ayuno de 8-12 horas) puncionando la vena cubital media (del antebrazo no dominante) empleando una aguja estéril BD *Vacutainer PrecisionGlide* 21Gx38mm acoplada a BD *Vacutainer one-use holder*.
2. Una vez que se logra la punción venosa, se coloca el tubo BD *Vacutainer* tapón rojo con activador de coagulación en el BD *Vacutainer one-use holder* y se llena el tubo con aproximadamente 5ml de sangre venosa.
3. Se retira el tubo y se coloca a temperatura ambiente en una gradilla; se retira la aguja y se aplica una torunda con alcohol presionando firme en la zona de punción para hacer hemostasia de la zona colocando un parche adhesivo.
4. El tubo BD *Vacutainer* tapón rojo con activador de coagulación se centrifuga a temperatura

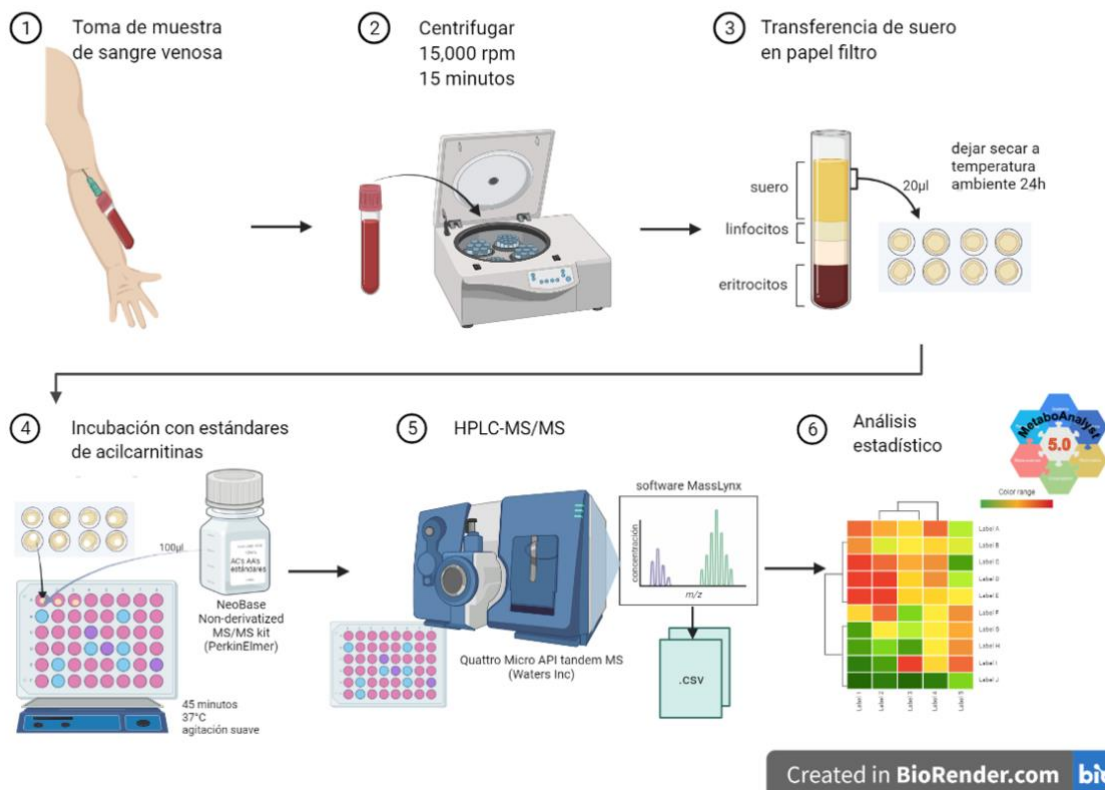
1. Se colocan 20 µl de suero en un papel filtro (papel filtro Whatman 903, *Dassel, Germany*) el cual se deja secar por 24 horas a temperatura ambiente.
2. Una vez seco el papel filtro se perfora en discos de 3mm de diámetro y se colocan en una placa de 96 pozos.
3. Se agregan 100µl de los estándares de acilcarnitinas y aminoácidos provenientes del kit *NeoBase™ Non-derivatized MS/MS de PerkinElmer*, y se incuba la placa a una temperatura de 37°C con agitación suave por 45 minutos.
4. Al término de la incubación se inyectan 40 µl (10-40 µl) de cada pozo a la bomba de HPLC para su ionización por medio de la técnica de electroespray (en modo positivo) empleando

- nitrógeno. Gas nitrógeno se emplea para desolvatación y nebulización.
- Los iones pasan a través de un analizador de masas (MS1) cuya función es la separación de los iones de interés en relación con su masa/carga correspondiente (m/z).
 - Los iones de interés son fragmentados a través de su paso por una cámara de colisión (empleando gas argón como gas de colisión) cuya función es generar diferentes fragmentos iónicos característicos de cada compuesto.
 - Estos fragmentos iónicos pasan a través de un segundo analizador de masas (MS2) en donde finalmente llegan al detector quien registra y amplifica la señal proveniente del espectrómetro de masas.
 - Finalmente se envía la señal a un procesador de datos en donde se registra la representación gráfica de los iones en relación a su valor m/z, ajustando cada señal de acuerdo con el porcentaje de especies más abundantes en la muestra a evaluar (empleando el *software MassLynx*).
 - Los datos se exportan en formato .csv en donde se obtienen valores cuantitativos de cada metabolito que detecta el kit.
 - Finalmente, para generar un análisis metabolómico se emplea *MetaboAnalyst 5.0* (<https://www.metaboanalyst.ca>) en donde el archivo .csv se puede emplear para realizar: análisis univariado, análisis multivariado, análisis de biomarcadores, meta-análisis estadístico y análisis de poder estadístico.

Tabla 4. Posibles problemas comunes

Paso	Problema	Posible razón	Solución
1-4	Hemólisis	Problemas al momento de toma de muestra	<ul style="list-style-type: none"> Al momento de toma de muestra dejar secar completamente el área posterior a la asepsia de la zona a puncionar. Nunca realizar la extracción de sangre a través de un hematoma. Es recomendable que la toma de muestra la realice un personal experimentado. Invertir suavemente el tubo posterior a la obtención de muestra de sangre venosa sin agitar.
		Condiciones de pre-centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> El tiempo máximo para la centrifugación del tubo con la muestra sanguínea no debe exceder de 2 horas. Asegurarse que la muestra de suero se encuentre completamente coagulada antes de proceder a la centrifugación. El transporte de las muestras se debe de realizar preferentemente a temperatura ambiente, cuidando que el tubo se encuentre en gradilla en posición vertical y sin agitar.
5	No hay transferencia correcta de la muestra en el papel filtro	No se logra una cobertura adecuada de la muestra en el papel filtro	<ul style="list-style-type: none"> Siempre asegurarse que la totalidad de la muestra permee adecuadamente en el papel filtro. Asegurarse que la cantidad de suero sea la adecuada. Evitar la exposición directa a luz solar y gases tóxicos que puedan interferir con la extracción posterior de los metabolitos.
8-11	Picos de baja intensidad o inestables	Nebulización pobre	<ul style="list-style-type: none"> Asegurarse que los ajustes sean acordes a la velocidad de flujo deseada (para este caso se recomiendan 10-40µl de muestra con intervalos de 4 minutos entre muestra): fuente de desolvatación, temperatura de desolvatación (verificar que en la fuente líquida no exista líquido ya que puede indicar que la temperatura es muy baja) y flujo de gas (verificar que estabilidad de flujo del nitrógeno sea adecuada y que la presión del nitrógeno se encuentre 90-100 psi).
		Problema con el sistema de entrada de la muestra	<ul style="list-style-type: none"> Verificar que la jeringa de inyección no contenga fugas y que se encuentre en la posición correcta. Verificar que los viales contengan muestra suficiente.
		Fuga de líquido en el sistema HPLC	<ul style="list-style-type: none"> Verificar que no existan fugas de líquidos en el sistema de HPLC.
		Problemas para abrir software MassLynx	<ul style="list-style-type: none"> Reiniciar la computadora y el equipo (presionar el switch "embedded PC Reset). Esperar 3 minutos y volver a encender el equipo y la computadora (se debe de escuchar un sonido que indica que el reinicio es adecuado) y abrir el software MassLynx.
14	No se puede iniciar el análisis en MetaboAnalyst	No se puede exportar los datos a MetaboAnalyst	<ul style="list-style-type: none"> Verificar que el archivo se encuentre en formato .csv Verificar el orden y conformación de la base de datos previo al paso de adjuntar el archivo.

Esquema del procedimiento



Referencias

- Tan, S. Z., Begley, P., Mullard, G., Hollywood, K. A., and Bishop, P. N. (2016) Introduction to metabolomics and its applications in ophthalmology. *Eye (Lond)*. 30, 773–783
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., and Siuzdak, G. (2016) Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 451–459
- Aderemi, A. V., Ayeleso, A. O., Oyedapo, O. O., and Mukweho, E. (2021) Metabolomics: A Scoping Review of Its Role as a Tool for Disease Biomarker Discovery in Selected Non-Communicable Diseases. *Metabolites*. 10.3390/METABO11070418
- Shah, N. J., Sureshkumar, S., and Shewade, D. G. (2015) Metabolomics: A Tool Ahead for Understanding Molecular Mechanisms of Drugs and Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 247
- Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., and Ferrari, R. (2018) Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief. Bioinform.* 19, 286–302
- Boesl, U. (2017) Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrom. Rev.* 36, 86–109
- Awad, H., Khamis, M. M., and El-Aneed, A. (2014) Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>. 50, 158–175
- Pitt, J. J. (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* 30, 19
- Rockwood, A. L. (2004) The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology. Gary Siuzdak. San Diego, CA: MCC Press, 2003, 286 pp., \$49.00, softcover. ISBN 0-9742451-0-0. *Clin. Chem.* 50, 1108–1109
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., De Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., and Xia, J. (2021) MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* 49, W388–W396
- Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006) XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787
- Fu, J., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Liu, J., Tang, J., Yang, Q., Sun, H., Qiu, W., Ma, Y., Li, Z., Zheng, M., and Zhu, F. (2021) Optimization of metabolomic data processing using NOREVA. *Nat. Protoc.* 2021 171. 17, 129–151
- Kuo, T. C., Tian, T. F., and Tseng, Y. J. (2013) 3Omics: A web-based systems biology tool for analysis, integration and visualization of human transcriptomic, proteomic and metabolomic data. *BMC Syst. Biol.* 7, 1–15
- Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duprier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J. F., Jacob, D., Goultier, S., Thévenot, E. A., and Caron, C. (2015) Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics.* 31, 1493–1495
- Andersson-Hall, U., Gustavsson, C., Pedersen, A., Malmödin, D., Joellsson, L., and Holmång, A. (2018) Higher Concentrations of BCAAs and 3-HIB Are Associated with Insulin Resistance in the Transition from Gestational Diabetes to Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.* 10.1155/2018/4207067

16. Zheng, Y., and Hu, F. B. (2015) Comprehensive metabolomic profiling of type 2 diabetes. *Clin. Chem.* 61, 453–455
17. Floegel, A., Stefan, N., Yu, Z., Mühlenbruch, K., Drogan, D., Joost, H. G., Fritsche, A., Häring, H. U., De Angelis, M. H., Peters, A., Roden, M., Prehn, C., Wang-Sattler, R., Illig, T., Schulze, M. B., Adamski, J., Boeing, H., and Pischon, T. (2013) Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes.* 62, 639–648
18. Newgard, C. B. (2012) Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab.* 15, 606–614
19. Drogan, D., Dunn, W. B., Lin, W., Buijsse, B., Schulze, M. B., Langenberg, C., Brown, M., Floegel, A., Dietrich, S., Rolandsson, O., Wedge, D. C., Goodacre, R., Forouhi, N. G., Sharp, S. J., Spranger, J., Wareham, N. J., and Boeing, H. (2015) Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study. *Clin. Chem.* 61, 487–497
20. Christopher, B. N. (2012) Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab.* 15, 606–614
21. Driscoll, D. A., and Gross, S. J. (2008) Acylcarnitine profile analysis. *Genet. Med.* 10, 156
22. Marieke, G., S., Frederic, M. V., Sander, M. H., and Maarten, R. S. (2013) Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes.* 62, 1–8
23. Newgard, C. B. (2017) Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 25, 43–56
24. Chorell, E.; Hall, U. A.; Gustavsson, C.; Berntorp, K.; Puhkala, J.; Luoto, R.; Olsson, T.; Holmäng, A. (2017) Pregnancy to postpartum transition of serum metabolites in women with gestational diabetes. *Metab.* 72, 27–36.
25. Roy, C., Tremblay, P.Y., Anassour-Laouan-Sidi, E., Lucas, M., Forest, J.C., Giguère, Y., Ayotte, P. (2018) Risk of gestational diabetes mellitus in relation to plasma concentrations of amino acids and acylcarnitines: A nested case-control study. *Diabetes Res Clin Pract.* 140:183-190.
26. Batchuluun, B., Al Rijjal, D., Prentice, K.J., Eversley, J.A., Burdett, E., Mohan, H., Bhattacharjee, A., Gunderson, E.P., Liu, Y., Wheeler, M.B. (2018) Elevated Medium-Chain Acylcarnitines Are Associated With Gestational Diabetes Mellitus and Early Progression to Type 2 Diabetes and Induce Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Diabetes.* 67, 885–897
27. Metzger, B. E., Phelps, R. L., Freinkel, N., and Navickas, I. A. (1980) Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids, and individual amino acids. *Diabetes Care.* 3, 402–409
28. Sander, M. H., and Ronald, J. W. (2010) A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 469–477
29. Lynch, C. J., and Adams, S. H. (2014) Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014 1012. 10, 723–736



M. en C. MELISSA RAZO AZAMAR
ORCID: 0000-0001-7600-3046

La M. en C. Melissa Razo Azamar estudió la Licenciatura en Médico Cirujano en la Universidad Anáhuac México Norte.

Estudio además la Maestría en Ciencias con especialidad en Bioquímica Clínica por la Universidad Nacional Autónoma de México siendo su proyecto de investigación la identificación de una huella metabolómica en mujeres que desarrollan diabetes gestacional.

Actualmente es candidata a Dra. del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México con el proyecto “Caracterización del perfil de microRNAs séricos en mujeres que desarrollan diabetes gestacional”.