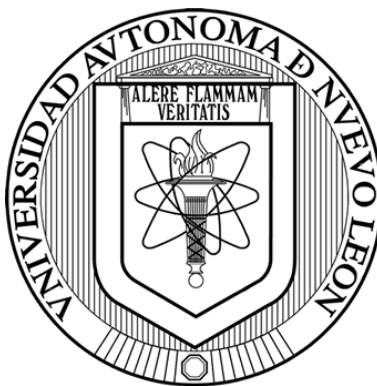


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO POR ^1H -RMN PARA LA OBTENCIÓN
DEL PERFIL METABOLÓMICO DE HECES EN UN MODELO MURINO DE
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Por

Q.C.B. AMY ISABEL ESPINOSA PEDROZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Química Biomédica**

Octubre, 2026

ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO POR ^1H -RMN PARA LA OBTENCIÓN
DEL PERFIL METABOLÓMICO DE HECES EN UN MODELO MURINO
DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo

Director de Tesis



Dr. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez

Co-Director de Tesis



Dra. Aracely García García

Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO POR ^1H -RMN PARA LA OBTENCIÓN
DEL PERFIL METABOLÓMICO DE HECES EN UN MODELO MURINO
DE ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Presentado por:

Q.C.B. Amy Isabel Espinosa Pedroza

AGRADECIMIENTOS

Quiero extender mi más grande agradecimiento a Dios, por permitirme llegar hasta aquí.

Agradezco y aprecio especialmente a:

Mi familia, por apoyarme y aconsejarme en la dedicación a mis estudios.

Mis amistades, por su apoyo moral y consideración en escuchar y darme ánimos al aventurarme en este reto (echarme porras, gracias).

Mi comisión de tesis, por sus valiosas aportaciones y compartir su área de expertise conmigo siendo claves para el desarrollo de este trabajo.

La Dra. Verónica Rivas por haber depositado su confianza en mí y exhortarme a dar y ser una mejor versión.

Mis compañeros y amigos del departamento de QA, por el apoyo para complementar con sus conocimientos versátiles, logrando tener un mayor impacto esta investigación.

Y a todos aquellos que tuvieron una participación en la formación de este proyecto.

RESUMEN

Amy Isabel Espinosa Pedroza

Fecha de graduación: 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Establecimiento de un método por ^1H -RMN para la obtención del perfil metabolómico de heces en un modelo murino de enfermedad de Parkinson.

Número de páginas:113

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias

Área de estudio: Ciencias de la salud

Propósito y Método del Estudio: La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo con alto índice de prevalencia a nivel mundial. Actualmente diversos estudios han propuesto al eje microbiota – intestino – cerebro como uno de los principales factores en la progresión del EP. Se desarrolló un método por ^1H -RMN para la obtención del perfil metabolómico no dirigido de heces de ratón. Para ello primero se establecieron las condiciones del tratamiento de la muestra con base en lo revisado en la bibliografía, procesando las muestras en 1:7 p/v con PBS 1x pH 7.4 (10% D_2O) además de establecer las condiciones de adquisición y procesamiento espectral. Como parte del desarrollo del método se realizó una validación parcial evaluando los parámetros de precisión, exactitud y robustez en muestras de ratón sano.

Se obtuvieron 28 muestras de heces congeladas del modelo murino de EP inducido por paraquat (PQ) previamente establecido, de las cuales 13 corresponden al grupo control y 15 al grupo tratado con PQ. Posteriormente se adquirieron los perfiles metabolómicos de ambos grupos. Dichos datos fueron procesados por análisis multivariable mediante herramientas de reconocimiento de pautas. Se realizó un estudio no supervisado con el Análisis de Componentes Principales (PCA) para establecer el preprocesamiento adecuado de los datos, identificar muestras atípicas y evaluar el agrupamiento natural de las muestras. Y con el análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA) como estudio

supervisado se confirmó la separación entre los grupos de estudio. Además, se determinaron las variables de mayor importancia que contribuyen a la diferencia entre los grupos.

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció un método por ^1H -RMN para la obtención de un perfil metabolómico de heces de ratón y se obtuvo, de forma preliminar el perfil metabolómico del modelo murino de EP inducido por PQ. Se construyó un modelo de PCA que permitió definir la corrección de línea base, la normalización probabilística por cocientes, el centrado a la media y el escalado de Pareto como el pretratamiento espectral adecuado para el análisis quimiométrico. Se determinó que las variables más importantes que diferencian los grupos, corresponden a regiones espectrales donde se presentan señales de hidrógeno de carbohidratos como la glucosa y de ácidos grasos de cadena corta, como el acetato, propionato y butirato. El perfil metabolómico del modelo murino de EP se considera un primer acercamiento a nuevos enfoques para la detección e identificación de señales diferenciadoras para un posible diagnóstico temprano de la enfermedad.

FIRMA DEL ASESOR: _____

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedad de Parkinson	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Etiología de la enfermedad de Parkinson	2
1.1.3 Enfermedad de Parkinson y microbiota intestinal	3
1.1.4 Diagnóstico.....	6
1.1.5 Tratamiento.....	7
1.1.6 Modelos experimentales para el estudio de la EP	7
1.2. Metabolómica	9
1.2.1 Definición.....	9
1.2.2 Clasificación	10
1.2.3 Metabolómica de muestras biológicas.....	10
1.2.4 Metabolómica en EP.....	12
1.2.5 Técnicas analíticas aplicadas en metabolómica	13
1.3 Resonancia Magnética Nuclear	15
1.3.1 Fundamentos.....	15
1.3.2 Espectro de ¹ H-RMN	17
1.3.3 Parámetros de adquisición en RMN	18
1.3.4 Parámetros de procesamiento en RMN.....	20
1.3.5 Aplicaciones de la RMN.....	21
1.3.6 Secuencias de pulsos aplicados en metabolómica	21
1.4 Análisis de Reconocimiento de Pautas.....	24
1.4.1 Definición.....	24
1.4.2 Clasificación	24
1.4.3 Preprocesamiento de los datos	25
1.4.4 Análisis de Componentes Principales.....	26
1.4.4.1 Representación gráfica.....	28
1.4.5 Mínimos Cuadrados Parciales con Análisis Discriminante	28
1.4 Justificación	31
1.5 Hipótesis	32
1.6 Objetivo General	32

1.8	Objetivos Específicos	32
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.	33
2.1	Reactivos	33
2.2	Equipos	33
2.3	Materiales.....	34
2.4	Programas de cómputo	34
2.5	Muestras biológicas.....	35
2.5.1	Obtención de las muestras	35
2.5.2	Obtención de las muestras de estudio.....	35
2.6	Desarrollo de las condiciones de extracción	36
2.6.1	Evaluación del efecto de la dilución	36
2.6.2	Selección del disolvente de extracción	37
2.6.3	Adquisición de los parámetros instrumentales	38
2.6.4	Parámetros de procesamiento de los espectros.....	39
2.6.5	Evaluación de la precisión	40
2.6.6	Evaluación de la exactitud	40
2.6.7	Evaluación de la robustez.....	41
2.6.8	Obtención de los perfiles metabolómicos del modelo murino de EP ..	42
2.6.9	Procesamiento de los espectros.....	43
2.7	Análisis Quimiométrico	44
2.7.1	Preprocesamiento de los datos	44
2.7.2	Análisis de componentes principales.....	45
2.7.3	Mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante	45
2.7.4	Evaluación de los modelos de análisis de reconocimiento de pautas	46
3	RESULTADOS.....	47
3.1	Evaluación del efecto de la dilución.....	47
3.2	Selección del disolvente de extracción.....	49
3.3	Parámetros de adquisición y procesamiento	50
3.3.1	Determinación del número de scans	50
3.3.2	Evaluación del tiempo de mezclado	51
3.3.3	Evaluación del tiempo de relajación	52

3.3.4	Evaluación del tiempo de adquisición	54
3.3.5	Evaluación de la ganancia del receptor	55
3.3.6	Condiciones de procesamiento	56
3.4	Evaluación de la precisión	57
3.5	Evaluación de la exactitud	58
3.6	Evaluación de la robustez	60
3.7	Obtención del perfil metabolómico del modelo murino de EP	63
3.8	Procesamiento de los espectros	64
3.9	Análisis quimiométrico	64
4	DISCUSIÓN	85
5	CONCLUSIONES	106
6	PERSPECTIVAS	108
	BIBLIOGRAFÍA	109

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Comparación entre las técnicas analíticas más empleadas en metabolómica.	14
2. Parámetros para la adquisición de los espectros de ¹ H-RMN con la secuencia de pulsos noesygppr1d.	39
3. Condiciones de los parámetros de adquisición a optimizar.	39
4. Diseño de experimentos.	42
5. Condiciones de adquisición de los espectros de ¹ H-RMN noesygppr1d.	43
6. Valores obtenidos de %DER para la precisión intradía.	57
7. Valores obtenidos de %DER para la precisión interdía por cada señal seleccionada.	58
8. Porcentajes de recuperación de las muestras adicionadas.	60
9. Resultados estadísticos del diseño experimental.	61
10. Comparación de los modelos no supervisados.	73
11. Posibles metabolitos diferenciadores.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Espectro de ^1H -RMN del etanol.	17
2. Regiones del desplazamiento químico de los grupos funcionales en un espectro de ^1H -RMN.	18
3. Esquema de la secuencia de pulsos noesygppr1d y los principales parámetros de adquisición.	23
4. Diagrama de dos componentes principales, para las dos variables.	27
5. Descomposición matricial en componentes principales a partir de una matriz.	28
6. Espectros de ^1H -RMN obtenidos con diferente cantidad de muestra a partir de un mismo pool de heces de ratón sano.	48
7. Espectros de ^1H -RMN de muestras de heces de ratón sano extraídas con tres disolventes diferentes (PBS:CD ₃ OD 1:1 en color verde, PBS 1X (10% D ₂ O) en color rojo, CD ₃ OD en color azul).	49
8. Ampliación en la región a campo bajo de los espectros de ^1H -RMN de muestras de heces de ratón sano extraídas con tres disolventes diferentes (PBS:CD ₃ OD 1:1 en color verde, CD ₃ OD en color rojo, PBS 1x (10% D ₂ O) en color azul).	50
9. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distinto valor de NS, mostrando una ampliación a 5.8 ppm.	51
10. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distinto valor de D8 (s), mostrando el área de la supresión de la señal de H ₂ O.	52
11. Figura 11. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con diferente tiempo de D1, el color azul corresponde a 2 s, el color verde a 4 s y el color rojo a 5 s.	53

12.	Gráfico de los FID obtenido a partir de una muestra problema. El inciso a) obtenido con AQ=1.7 s, b) obtenido con AQ=2.7 s, c) obtenido con 5.45 s.	54
13.	Espectros de ^1H -RMN obtenidos con distinto valor de AQ, siendo el color azul AQ=5.4, el color rojo AQ= 4.0 y en color el AQ=1.7.	55
14.	Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, de una muestra de heces de ratón sano. El espectro azul corresponde a un valor de RG = 203, en color rojo un RG=128 y en color verde un RG= 64.	56
15	Espectro representativo para la evaluación de la precisión con las señales elegidas, con el desplazamiento químico y su integración.	57
16	Espectros sobrepuestos de muestra sin adicionar (rojo) y adicionada con estándar de fenilalanina (azul).	59
17	Espectro obtenido en el experimento no. 7 del diseño de experimentos y la integración para las señales seleccionadas.	61
18	Gráfico de coeficientes de efectos principales para la señal a 5.2 ppm.	61
19	Diagrama de Pareto de efectos para las variables sobre la señal a 5.2 ppm.	62
20	Espectros obtenidos de las muestras del modelo murino con enfermedad de Parkinson.	63
21	Espectros importados en programa Matlab antes y después de eliminar las regiones seleccionadas.	65
22	Señal a 1.9 ppm antes y después de aplicar el algoritmo iCoShift.	66
23	Espectros sobrepuestos con corrección de línea base.	67
24	Espectros sobrepuestos aplicando corrección de línea base y normalización.	67
25	Espectros superpuestos con el tratamiento: A. Centrado y B. Escalado aplicado.	68
26	Gráfico de scores para los tres componentes principales con el tratamiento inicial (PQN y centrado a la media). Las muestras del grupo control y muestras del grupo expuesto a paraquat.	69

27	Gráfico de scores con tres componentes principales para el tratamiento (Corrección de línea base, PQN, centrado a la media y escalado Pareto). Las muestras del grupo control y muestras del grupo expuesto a paraquat.	71
28	Gráfico de T2 frente a residuos Q.	73
29	A) Corresponde al gráfico de Scores para dos CP después de excluir muestras y B, Gráfica con 3 CP.	74
30	Gráfico de loadings del modelo de PCA final con 29 muestras. A) Gráfico de loadings de la PC1. B) Gráfico de loadings de la PC2. C) Gráfico de loadings de la PC3	76
31	A. Gráfico de T2 frente a Q residual del modelo PLS-DA, B. Gráfico de la respuesta predicha para la clase control con punto de corte 0.4	77
32	Gráfico de scores de la LV1 frente a la LV2 del modelo construido con todas las muestras. Señaladas muestras mal clasificadas.	78
33	A. Gráfico de la validación cruzada de la respuesta predicha del grupo control frente a la respuesta medida del grupo control con todas las muestras, B. Una vez excluidas las muestras atípicas.	80
34	Gráfico de scores de la LV1 frente a la LV2 del modelo construido sin las muestras atípicas.	81
35	Gráfico de loadings del modelo PLS-DA. A. Para la LV1. Para la LV2.	82
36	Gráfico de la Importancia de la variable en la proyección para el grupo control.	83
37	Curvas ROC y relación sensibilidad – especificidad frente al umbral para el grupo control (Y1) y el grupo modelo con EP (Y2).	83
38	Muestras en función de la A) clase estrictamente predicha, B) clase predicha no asignada, C) clase predicha múltiple.	84
39	Muestras en función de la respuesta predicha para la clase del grupo control.	84

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Concentración micromolar

% p/v	Porcentaje peso volumen
% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
1D	Unidimensional
^1H -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AQ	Tiempo de adquisición
B_0	Campo magnético externo
CD_3OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografía de Gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
D1	Tiempo de relajación
D_2O	Óxido de deuterio o agua deuterada
D8	Tiempo de mezclado
Da	Dalton
EM	Espectrometría de Masas
EP	Enfermedad de Parkinson
EUA	Estados Unidos de América

FID	Decaimiento Libre de Inducción
HMDB	Base de Datos de Metaboloma Humano
LV	Variable latente
M	Concentración molar
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
n	Tamaño de muestra
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NS	Número de scans
PBS	Buffer de fosfatos salino
PC	Componente principal
PCA	Análisis de Componentes Principales
pH	Potencial de Hidrógeno
PLS-DA	Análisis Discriminantes de Mínimos Cuadrados Parciales
ppm	Partes por millón
PQ	Paraquat
RG	Ganancia del Receptor
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Segundo

s	Desviación estándar
S/R	Relación Señal Ruido
SIMCA	Modelado suave e independiente de analogías de clase
SW	Ventana espectral
T ₁	Tiempo de relajación longitudinal
T ₂	Tiempo de relajación transversal
TD	Número de puntos
TSP	Ácido 2,2,3,3- Tetradeutero-3-(Trimetilsilil)-Propiónico
γ	Constante Giromagnética
δ	Desplazamiento químico

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Enfermedad de Parkinson

1.1.1 Definición

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por movimientos involuntarios o no controlados, provocado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la zona de la sustancia negra pars compacta del cerebro.

Este trastorno se presenta principalmente en la vejez, por lo que se estima que la prevalencia de casos aumentará conforme se incrementa la esperanza de vida en el ser humano (Ostrakhovitch, Ono, & Yamasaki, 2025).

Los síntomas de la EP se dividen en motores y no motores. Ambos tipos pueden manifestarse en cualquier etapa del padecimiento, desde su inicio hasta las fases más avanzadas. La diferencia principal radica en cómo evoluciona su gravedad a lo largo del tiempo; por ejemplo, los síntomas motores suelen ser los más evidentes y severos al momento de establecer el diagnóstico clínico (Wasim & Shinde, 2025).

Entre los principales síntomas motores de la etapa temprana se presentan: la bradicinesia, que es la lentitud generalizada al moverse, la disminución de los movimientos espontáneos; la rigidez muscular y el temblor en reposo de las extremidades. En etapas posteriores, además de estos síntomas, se añaden la inestabilidad postural y la incapacidad de desplazarse.

La pérdida del olfato, los trastornos del sueño, así como la ansiedad y depresión son manifestaciones no motoras que se presentan en la primera etapa de la enfermedad. Posteriormente, en etapas avanzadas de la EP los síntomas no motores empeoran, aproximadamente un tercio de los pacientes desarrollan demencia, afectación en la memoria, y llegan a padecer alucinaciones y psicosis (Tolosa, Garrido, W Scholz, & Werner, 2021).

1.1.2 Etiología de la enfermedad de Parkinson

Entre los mecanismos que se proponen se encuentran la agregación de la alfa sinucleína, así como el mal plegamiento de esta proteína, la desregulación de la homeostasis intracelular del calcio, la neuroinflamación y el estrés oxidativo. La alteración fisiopatológica que da lugar a los síntomas es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, pero los mecanismos patogénicos que la causan no están completamente esclarecidos.

Por lo cual la EP se considera multifactorial y se ha relacionado con diferentes factores, genéticos y ambientales.

Se ha reportado que cerca del 10% de los casos se deben a causas genéticas y de este porcentaje, entre el 10% y el 25% a herencia familiar, el resto,

son casos esporádicos. Entre los genes relacionados con la EP se encuentran: PARK1, PARK2, PARK5, PARK6, PARK7 y PARK8 (Elizondo, Dector, Martínez, Martínez, & Esmer, 2011).

Aproximadamente el 85% de los casos se debe a causas idiopáticas. Entre los factores ambientales se ha asociado el desarrollo de la EP con el uso de pesticidas y herbicidas (Zafar & Yaddanapudi., 2025).

1.1.3 Enfermedad de Parkinson y microbiota intestinal

Una nueva teoría sobre el origen de la enfermedad proviene de diversos reportes que mencionan la disfunción gastrointestinal como el principal síntoma no motor temprano en la EP.

En el 2003, Braak y colaboradores propusieron la “teoría anatómica ascendente” donde las inclusiones de alfa-sinucleína podrían iniciar en el intestino y evolucionar hacia el cerebro (Braak, et al., 2003). Años después, Kim S., y su equipo de trabajo demostraron en un modelo murino transgénico de EP, que la vagotomía prevenía la transmisión neuronal de alfa-sinucleína desde el intestino hacia el sistema nervioso central, interviniendo así en el desarrollo de déficits motores.

El eje conocido como microbiota – intestino – cerebro hace referencia a la comunicación bidireccional del intestino hacia el cerebro a través del nervio vago y el sistema circulatorio. La importancia de este eje en el desarrollo de la EP se puede explicar a través del siguiente proceso: en el cual las alteraciones en la microbiota intestinal y sus metabolitos producen un estado inflamatorio,

rompiendo la barrera intestinal y provocando la liberación de las citocinas proinflamatorias que promueven el mal plegamiento de la alfa-sinucleína, posteriormente estas señales microbianas y metabólicas alcanzan la circulación y generarán inflamación sistémica. La alfa-sinucleína mal plegada en el intestino puede transferirse al cerebro a través del nervio vago en una transmisión bidireccional; en el cerebro la alteración de la barrera hematoencefálica permite la entrada de la alfa-sinucleína mal plegada y de otros productos patológicos al cerebro, activando la microglía y los astrocitos, lo que produce la neuroinflamación y la pérdida dopaminérgica, características en la EP (Zhang, Tang, & Guo, 2023).

La autofagia se encuentra entre los factores que pueden modificar la microbiota intestinal. De forma general la autofagia es el proceso de degradación intracelular de organelos y macromoléculas para por medio de los lisosomas hacer el reciclaje. Cuando el proceso de autofagia intestinal se encuentra alterado, el intestino se inflama y libera diversas moléculas a la circulación, entre ellas oxígeno y radicales libres, debido a esto, las bacterias que producen ácidos grasos de cadena corta mueren y proliferan bacterias oportunistas que sí toleran la inflamación. En un perfil metabolómico esperaríamos observar una disminución en la producción de metabolitos, como los ácidos grasos de cadena corta.

Como antecedente para este trabajo se presenta lo reportado por un grupo de investigación del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, de la UANL que determinó que la autofagia mediada por metformina y trehalosa tiene un efecto neuroterapéutico en la EP (Gopar-Cuevas, et al., 2023).

Anteriormente, determinaron que la estimulación de la autofagia con rapamicina disminuye la muerte neuronal dopaminérgica mediada por estrés oxidativo en el modelo de EP inducido por paraquat (PQ) (Ramírez Moreno, 2016). Posteriormente, evaluaron *in vivo* el efecto de los inductores, metformina y trehalosa, en el modelo animal de EP inducido por PQ. A través de diversos ensayos, demostraron que ambos inductores de autofagia ejercen un efecto antioxidante, mejoran la actividad mitocondrial y disminuyen la muerte celular dopaminérgica inducida por PQ. Debido a la evidencia preclínica positiva, a los antecedentes de síntomas gastrointestinales y a la disbiosis (alteraciones en la microbiota intestinal) en etapas tempranas en pacientes con EP (Zhang, Tang, & Guo, 2023), se plantea la posibilidad de que se produzcan efectos neuroprotectores a través del eje microbiota-intestino-cerebro (Gopar-Cuevas, et al., 2023).

Hasta el momento, debido a su complejidad, no ha sido posible establecer una composición específica de la microbiota intestinal ni de sus metabolitos como biomarcadores de esta enfermedad.

El estudio del perfil metabolómico a partir de muestras no invasivas, como las heces, representa una de las alternativas más prometedoras en la investigación de la EP. Si bien, la EP se ha considerado una patología neurodegenerativa, la evidencia actual indica que se trata de una enfermedad multisistémica donde el eje microbiota-intestino-cerebro interviene de forma importante. Debido a que un porcentaje mayor al 50% de los pacientes con EP presentan disfunción gastrointestinal mucho tiempo antes de la aparición de los síntomas motores, el análisis de las heces en modelos experimentales ofrece una

ventana única a las fases tempranas de la enfermedad (Zhang, Tang, & Guo, 2023).

1.1.4 Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico de la EP se centra en una evaluación exhaustiva de los pacientes, tomando en cuenta la historia clínica y realizando la exploración física. Los criterios diagnósticos clínicos están regulados por la Sociedad Internacional de Parkinson y Trastornos del Movimiento, que se basan en la opinión de neurólogos expertos. La tasa de error en el diagnóstico clínico va desde el 15 al 30%, debido principalmente a que algunos síntomas o trastornos clínicos pueden presentarse en otras enfermedades neurodegenerativas (Tolosa, Garrido, W Scholz, & Werner, 2021).

Debido a que los síntomas motores suelen presentarse tras una pérdida de más del 50% de las neuronas dopaminérgicas, los estudios de imagen, como la resonancia magnética, no son útiles en las primeras etapas de la enfermedad (Kumari, S., et al. 2020).

Se estima que la aparición de los síntomas no motores precede a la de los síntomas motores, por lo que un estudio más profundo de estos síntomas podría identificar los síntomas prodrómicos de la EP y contribuir al diagnóstico y detección temprana de la enfermedad (Schapira et al., 2017; Tolosa et al., 2021).

1.1.5 Tratamiento

El tratamiento farmacológico está enfocado en tratar los síntomas motores y no motores que presentan los pacientes por medio de medicamentos, terapias físicas y en algunos casos, terapia de estimulación cerebral.

Debido a que los síntomas motores ocurren por la acción de la acetilcolina, que se encuentra en exceso debido al desequilibrio que ocurre por la pérdida de células dopaminérgicas en el cerebro, se recetan medicamentos anticolinérgicos, inhibidores de la catecol-o-metiltransferasa y agonistas de la dopamina (Gopar Cuevas, et al., 2021).

Actualmente no existe un tratamiento que disminuya la progresión de la enfermedad. En otras patologías neurológicas, identificar la causa que provoca la enfermedad ha contribuido a su prevención (Dorsey & Bloemb, 2024).

1.1.6 Modelos experimentales para el estudio de la EP

Hasta ahora, no se han encontrado hallazgos importantes en el tratamiento clínico de la EP. Por lo que las investigaciones en el tratamiento y diagnóstico de ésta requieren el desarrollo de modelos animales científicamente sólidos que repliquen las características de la enfermedad (Sui et al., 2024).

Nuevos modelos animales transgénicos se han utilizado para el estudio de enfermedades complejas. Ya se han identificado múltiples genes causantes de la EP, por lo que, mediante la manipulación, ya sea por sobreexpresión o silenciamiento genético de genes como el SNCA, LRRK2 y PRKN, se crea el

modelado transgénico en ratones y ratas (Sui, Qin, Li, Guodong, & Yuxiang, 2024).

Sin embargo, la mayoría de los casos de EP son de origen idiopático, por lo que se requieren modelos de exposición ambiental. Estos modelos se basan principalmente en la administración de neurotoxinas, como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). El modelo con la 6-OHDA es uno de los más antiguos; no cruza la barrera hematoencefálica por lo que debe inyectarse directamente en la zona de la sustancia negra del cerebro. Debido a eso, fue sustituido por el MPTP, al ser mucho más práctico de administrar a los roedores por vía intraperitoneal. Fue descubierto como contaminante en una droga de diseño, al comprobar que su forma tóxica, el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), era captado por las neuronas dopaminérgicas e inhibía el complejo mitocondrial I de la cadena de transporte de electrones, provocando estrés oxidativo y muerte celular.

Se ha reportado que una gran variedad de los pesticidas usados actualmente son neurotóxicos. Estudios epidemiológicos en EUA han asociado la exposición a algunos pesticidas y herbicidas como la rotenona y el paraquat con el desarrollo de la EP. Especialmente, se determinó en un estudio que los habitantes cercanos a un pastizal donde se rociaba con PQ tenían el doble de probabilidades de desarrollar la EP. Los estudios experimentales han demostrado que el PQ inhalado se acumula en varias regiones cerebrales examinadas, especialmente en el bulbo olfativo (Dorsey & Bloembergen, 2024). El mecanismo de acción para inducir la EP es similar al del modelo con MPTP, que induce daño por estrés oxidativo, lo que conduce directamente a la pérdida de neuronas

dopaminérgicas, al generar una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno e inhibir la cadena de transporte de electrones.

1.2. Metabolómica

1.2.1 Definición

La metabolómica pertenece a las ciencias ómicas, las cuales son las disciplinas biológicas que estudian el conjunto de todas las moléculas presentes en un sistema vivo, así como sus interacciones, para comprender sistemas biológicos complejos. Abordan el estudio de la enfermedad al analizar de forma masiva el conjunto completo de moléculas (genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma) para comprender sus mecanismos biológicos internos, la interacción entre factores genéticos y ambientales, y la identificación de biomarcadores para diagnósticos más precisos y tratamientos personalizados (Trifonova, 2020).

Por lo tanto, la metabolómica es la disciplina que permite la identificación y cuantificación de metabolitos en una célula o muestra en un tiempo determinado. Los metabolitos son moléculas orgánicas pequeñas en un rango de 1000 a 1500 Da provenientes de diversos procesos metabólicos del cuerpo y cumplen una variedad de funciones esenciales en el organismo, desde la producción de energía hasta la eliminación de desechos. Por lo que una alteración en la cantidad, presencia o ausencia de algunos de estos metabolitos puede indicar una alteración en el sistema biológico (Jeffrey R. Idle, 2007). Los

metabolitos pueden ser de origen endógeno, producidos por el propio cuerpo, o exógenos, provenientes de fuentes ajenas como fármacos o contaminantes ambientales, entre otros.

1.2.2 Clasificación

Principalmente, los estudios de metabolómica se pueden llevar a cabo de forma dirigida y no dirigida. La metabolómica dirigida se centra en el análisis y cuantificación de metabolitos previamente identificados y es muy útil para validar biomarcadores y vías metabólicas alteradas. Por otra parte, la metabolómica no dirigida busca identificar y perfilar tantos metabolitos como sea posible en una muestra, y este enfoque requiere el uso de bases de datos para la identificación de los metabolitos presentes (Jeffrey R. Idle, 2007).

1.2.3 Metabolómica de muestras biológicas

Existen distintos tipos de muestras biológicas para la metabolómica, entre ellos, las de origen biológico pueden ser extractos vegetales, células en cultivo, tejidos de animales o humanos y fluidos corporales. El principal uso de la metabolómica en biofluidos es la identificación de biomarcadores que reflejen alteraciones en rutas bioquímicas, en la interacción microbiota–huésped y en los procesos patológicos sistémicos.

Entre los biofluidos más comunes se encuentran la sangre (suero y plasma), líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, semen y heces. Debido a que en la metabolómica se analiza el conjunto completo de metabolitos presentes en un

sistema biológico, el análisis nos brindará información sobre el estado actual del individuo, permitiendo realizar el diagnóstico y la predicción de enfermedades, evaluar la respuesta a un fármaco, el estado dietético y bioquímico, entre otros hallazgos.

Dentro del grupo de trabajo de nuestro departamento, se desarrolló un estudio de metabolómica por RMN en muestras de orina para el diagnóstico en las primeras etapas de enfermedad renal en sujetos con diabetes tipo 2, obteniendo resultados favorables en los modelos estadísticos de predicción de clases. Posteriormente se utilizaron muestras de suero para el análisis metabolómico dirigido y no dirigido por ^1H -RMN para detectar enfermedad renal inicial en la diabetes mellitus (Lucio-Gutiérrez et al., 2022) (Lucio-Gutiérrez et al., 2024).

Para este trabajo, el tipo de muestra utilizada fueron heces de ratones, porque reflejan cambios en el metabolismo intestinal. Las heces, recientemente han tenido un auge en la metabolómica debido principalmente a que son una muestra no invasiva, relativamente de sencilla obtención y representa la interacción entre la dieta, el microbioma intestinal y el metabolismo del huésped. Están compuestas en gran proporción por agua y bacterias, pero también por componentes alimentarios o metabolitos (Erben, Poschet, Schrotz King, & Brenner, 2021). Por lo que a la materia fecal se le considera una matriz muy heterogénea, debido a que muchos factores pueden influir en su aspecto y composición química, entre ellos se incluyen la dieta, el estado de salud del

sujeto, los medicamentos y la genética del huésped. Esto complica los esfuerzos por estandarizar los protocolos de extracción de metabolitos de la materia fecal.

1.2.4 Metabolómica en EP

Aunque la EP no es el resultado de un trastorno metabólico, la alteración celular y los cambios metabólicos desempeñan un papel importante en su desarrollo.

En la EP, algunos estudios metabolómicos han mostrado cambios en lípidos, aminoácidos, compuestos derivados de la fermentación bacteriana y marcadores de inflamación sistémica (Sampson, et al., 2016). Destacando la disminución de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), asociados con disbiosis intestinal y el aumento de la permeabilidad. Asimismo, se han identificado incrementos en metabolitos proinflamatorios, productos de proteólisis bacteriana y desequilibrio en el metabolismo energético, todos vinculados a la agregación de alfa-sinucleína y al deterioro dopaminérgico (Zhang, Tang, & Guo, 2023).

La disbiosis intestinal (alteración de la microbiota) se considera un biomarcador emergente. Esta disbiosis se correlaciona con cambios en los AGCC (reducidos en heces, pero aumentados en plasma) y en los perfiles de ácidos biliares (Ostrakhovitch, Ono, & Yamasaki, 2025).

1.2.5 Técnicas analíticas aplicadas en metabolómica

Tanto la cromatografía de líquidos como la de gases acoplada a espectrometría de masas (EM), las diversas técnicas de espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear (RMN) son los métodos analíticos más utilizados en el estudio de la metabolómica (Abdul-Hamid Emwas, 2019).

Al ser técnicas muy especializadas, se suelen utilizar de forma individual, y la elección entre una y otra depende del enfoque del estudio, la sensibilidad requerida y la naturaleza de los metabolitos, así como la matriz en la que se encuentran. Sin olvidar tomar en cuenta el alto costo del análisis y la disponibilidad de los equipos.

El flujo de trabajo independiente de la técnica a emplear es el siguiente: diseño del experimento, siendo el enfoque dirigido o no dirigido, la preparación de la muestra, la separación y detección de los metabolitos, el procesamiento de los datos mediante análisis multivariable y búsqueda en bases de datos para determinar las vías metabólicas alteradas.

La EM destaca por su sensibilidad y capacidad de detectar metabolitos en rangos de concentración de picomolar a femtomolar. Por otra parte, la espectroscopía de RMN es uno de los métodos más prometedores para estudios metabolómicos, ya que permite la medición no dirigida de metabolitos de forma cuantitativa y no destructiva (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre las técnicas analíticas más empleadas en metabolómica.

	Espectrometría de Masas	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
Fundamento	Se basa en la ionización de moléculas o átomos, que luego se aceleran y se separan en un analizador de masas en función de su relación masa-carga (m/z)	Interacción de la energía de radiofrecuencia con los núcleos atómicos con número cuántico con $I \neq 0$, en un campo magnético intenso
Técnica destructiva	Sí	No
Sensibilidad	Alta	Moderada
Reproducibilidad	Moderada	Alta
Principales ventajas	Acoplamiento con otras técnicas	Preparación mínima de la muestra
Desventajas	Extenso tratamiento de la muestra	Requiere de concentraciones en el rango de mM.

1.3 Resonancia Magnética Nuclear

1.3.1 Fundamentos

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear es una técnica analítica que, al igual que otras espectroscopías, se basa en la interacción (absorción) de un determinado tipo de energía con la materia, y se relaciona con la información a partir de los diferentes estados energéticos que suceden y la diferencia que se produce.

Una molécula puede absorber energía electromagnética en forma de radiofrecuencia, al ser sometida a condiciones especiales en un campo magnético externo intenso. El espectro de RMN se construye a partir de las señales de los picos de absorción en función de las radiofrecuencias.

El proceso por el que puede ocurrir la resonancia se debe a la propiedad que presentan los núcleos atómicos, que al igual que otras partículas, poseen una característica llamada espín nuclear, que es el momento angular intrínseco del núcleo atómico. Este espín, en términos cuánticos, puede tener un valor numérico de $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}$, el valor de I determina el número de orientaciones que puede tener un núcleo al interactuar con el campo magnético externo (B_0). Estos núcleos con espín nuclear diferente de cero pueden interactuar con campos magnéticos. Al colocar un campo magnético externo, los espines se pueden desplazar en dos direcciones, paralelo al campo o en dirección opuesta, y en ausencia de un campo magnético los espines se orientan al azar.

Los núcleos con $I \neq 0$, como el ^1H y el ^{13}C , con $I = \frac{1}{2}$, generan dos estados de espín. La forma más estable es conforme o a favor del campo magnético, para colocarlo en contra del campo magnético requiere de mayor energía y cuando ocurre el proceso de relajación al estado basal (de menor energía) es cuando los núcleos magnéticos están en resonancia con la radiación aplicada (Silverstein, 2005).

Cuando el pulso de energía se detiene, los espines regresan a su estado de relajación y se emite una señal que es recolectada por el detector, llamada FID (decaimiento por inducción libre) como señal desde el equipo, y mediante la Transformada de Fourier se produce el espectro de RMN, compuesto de la frecuencia de absorción en función de los picos de intensidad de las señales.

La ecuación de Larmor es la que relaciona el campo magnético aplicado y la frecuencia de radiación electromagnética que genera el fenómeno de la RMN:

$$\nu = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) (B_0)$$

Donde

ν = es la frecuencia de la radiación que causa la transición

γ = corresponde a la constante giromagnética, la cual es diferente para cada núcleo y,

B_0 = es el campo magnético aplicado (Silverstein, 2005).

1.3.2 Espectro de ^1H -RMN

La interpretación de un espectro de ^1H -RMN (figura 1) se basa en cuatro características principales de las señales obtenidas: 1) La posición de la señal, es decir el desplazamiento químico (δ), que indica el entorno químico del núcleo, se mide en partes por millón y usualmente se referencia con la señal de un estándar; 2) La intensidad de la señal (la integración), en donde se mide el área bajo cada pico y ésta es proporcional al número de átomos de hidrógeno en ese entorno químico; 3) La multiplicidad de la señal (acoplamiento spin-spin) se refiere al número de picos en los que se divide una señal, donde generalmente se sigue la regla $n+1$, donde n es el número de protones vecinos que no son químicamente equivalentes al protón observado; y 4) La constante de acoplamiento, J , que corresponde a la distancia o espacio entre los picos que conforman la señal, medida generalmente en Hz.

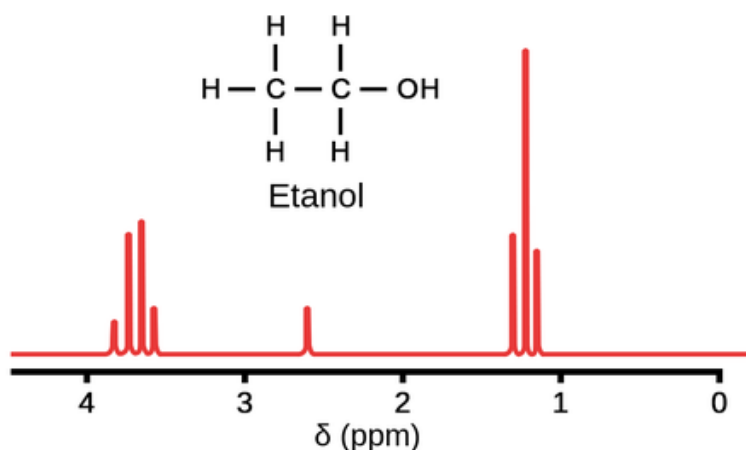


Figura 1. Espectro de ^1H -RMN del etanol.

Vale la pena mencionar que los desplazamientos químicos característicos de los protones de los distintos grupos funcionales se encuentran reportados en la literatura (figura 2). Por convención, el lado derecho del espectro con valores de desplazamiento químico más pequeños se llama campo alto, y la parte izquierda del espectro se llama campo bajo. Los grupos más electronegativos y las insaturaciones crean un “desapantallamiento”, colocando la señal de los protones observados hacia valores más altos de ppm (campo bajo).

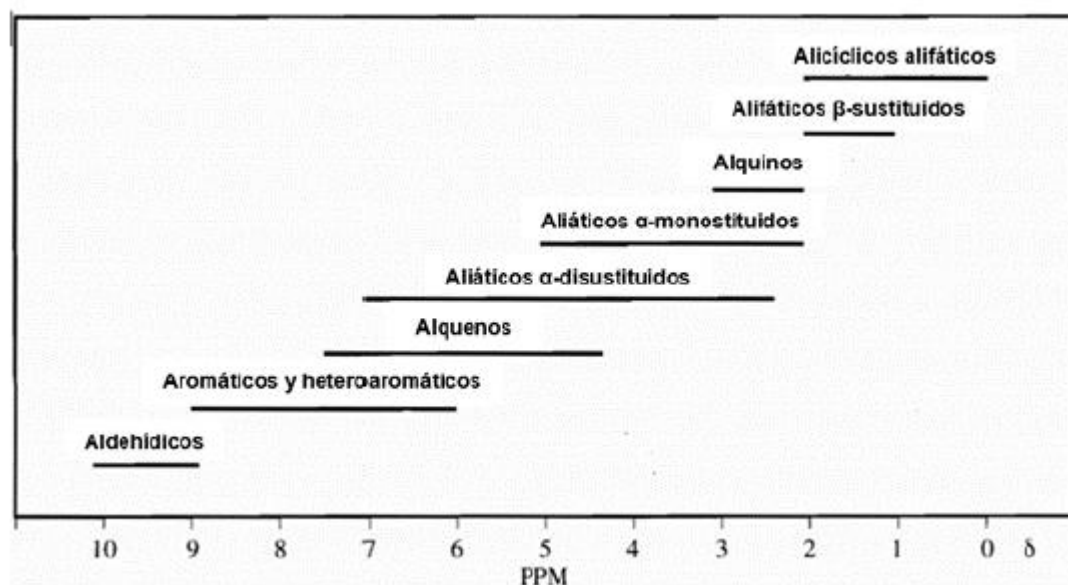


Figura 2. Regiones del desplazamiento químico de los grupos funcionales en un espectro de ^1H -RMN.

1.3.3 Parámetros de adquisición en RMN

En la RMN para establecer un método se necesita optimizar ciertos parámetros instrumentales en la adquisición de ^1H para obtener espectros reproducibles y de alta calidad. Entre los parámetros principales se encuentran:

el ángulo de giro, el tiempo de adquisición (AQ, acquisition time), número de scans (NS, number of scans), ganancia del receptor (RG, receiver gain) y tiempo de pulso (D1), como se muestra en la figura 3.

Generalmente, un pulso de 30° o 90° es un valor adecuado para obtener espectros de alta calidad (Monakhova & Diehl, 2017). El pulso de 90° en RMN cuantitativa proporciona la máxima intensidad de señal en relación con el tiempo de medición (EUROLAB, 2014). En RMN, existen dos tiempos de relajación, T_1 y T_2 , donde T_1 es la relajación espín – red y se orienta en un plano transversal mediante el pulso de 90° . Por lo regular, estableciendo el valor de D1 como 5 veces T_1 es suficiente para que la magnetización se relaje prácticamente por completo.

Por otra parte, el tiempo de adquisición (AQ) es el tiempo necesario para adquirir el FID tras la excitación de los núcleos con el pulso de radiofrecuencia, es decir el tiempo que transcurre desde el pulso hasta que se detecta la señal, los AQ comunes en ^1H -RMN van de 1 a 5 segundos. El AQ está directamente relacionado con el número de datos recopilados e inversamente relacionado con el ancho espectral, por lo que es importante tomarlo en cuenta al momento de definirlo.

La relación señal/ruido (S/R), es proporcional a la raíz cuadrada del número de escaneos promediados. Al aumentar el NS, mejora la S/R y aumenta la sensibilidad del equipo para obtener un espectro de mejor calidad. Para duplicar la señal S/R, se necesita cuadruplicar el NS, por lo tanto, se sigue la regla 2^n . Se recomienda un promedio mínimo de 8 para reducir los artefactos de la adquisición del espectro (Monakhova & Diehl, 2017).

En la parte instrumental el receptor consta de la bobina y el circuito que detecta y amplifica la señal antes de pasarla por el convertidor analógico – digital, por lo tanto, es importante ajustar la ganancia del receptor para que el convertidor no se sature y se trunque la señal FID (EUROLAB, 2014).

1.3.4 Parámetros de procesamiento en RMN

Así como los parámetros de adquisición, los parámetros de procesamiento son un punto a establecer después de obtener los espectros debido a que pueden ayudar a mejorar la calidad de los espectros y, es necesario que sean procesados de igual forma para comparar los resultados entre sí.

La función de ventana o apodización se utiliza comúnmente para mejorar la relación S/R de los espectros, multiplicando la FID exponencialmente. El llenado de ceros influye en la resolución de los espectros. En un FID obtenido con 32k al rellenar a cero con un factor de 2 se incrementan los puntos de datos de amplitud obteniendo una resolución digital equivalente a 64k, y debido a que se añaden ceros no hay puntos de datos no reales, observándose mejor los picos de las señales sin disminuir la relación S/R.

Uno de los puntos más importantes en el procesamiento de los espectros es la corrección de fase, ya que un mal manejo de esta puede provocar un error en la medición de la intensidad de las señales (Santosh Kumar Bharti, 2012). Por último, el ajuste de línea base ayuda a lograr una correcta integración del área del pico de las señales obtenidas y generalmente se realiza de forma automática por algoritmos propios del software del equipo.

1.3.5 Aplicaciones de la RMN

La RMN es principalmente conocida por sus aplicaciones en la elucidación de la estructura molecular de compuestos orgánicos e inorgánicos, ya sea de moléculas nuevas o desconocidas. Permite la obtención de perfiles metabolómicos e identificación y cuantificación de biomarcadores. Contribuye en el estudio del proteoma y transcriptoma. Mas recientemente la RMN cuantitativa se utiliza en el seguimiento de fármacos, metabolitos biológicos y productos naturales.

La RMN es una plataforma analítica robusta, no destructiva y altamente reproducible en metabolómica. Permite la cuantificación rápida y simultánea de diversos metabolitos con una preparación mínima de la muestra y sin separación cromatográfica.

1.3.6 Secuencias de pulsos aplicados en metabolómica

A raíz de que la mayoría de las muestras de origen biológico contienen una gran cantidad de agua, la obtención del espectro de ^1H -RMN requiere una supresión de la señal generada por el agua, ya que contiene muchos átomos de hidrógeno que genera una señal de intensidad muy alta que podría enmascarar la proporción de las señales que correspondan a los metabolitos de interés. Por lo que el uso de secuencias de pulsos que supriman esta señal permitirá una mejor detección de estos compuestos. Las secuencias de presaturación si bien son muy variadas, las que son utilizadas con mayor frecuencia en metabolómica

para este fin son las siguientes: WET, WATERGATE o PURGE, 1DNOESY PRESAT, Carr-Purcell-Meiboom-Gill (Moco, 2022).

La secuencia de pulsos 1D NOESY-presat se considera una de las mejores opciones a utilizar, ya que produce una mínima distorsión en el área del espectro cercana a 4.7 ppm, permitiendo mantener las señales de metabolitos como la glucosa, lactato y citrato, las cuales están cerca de la señal del agua.

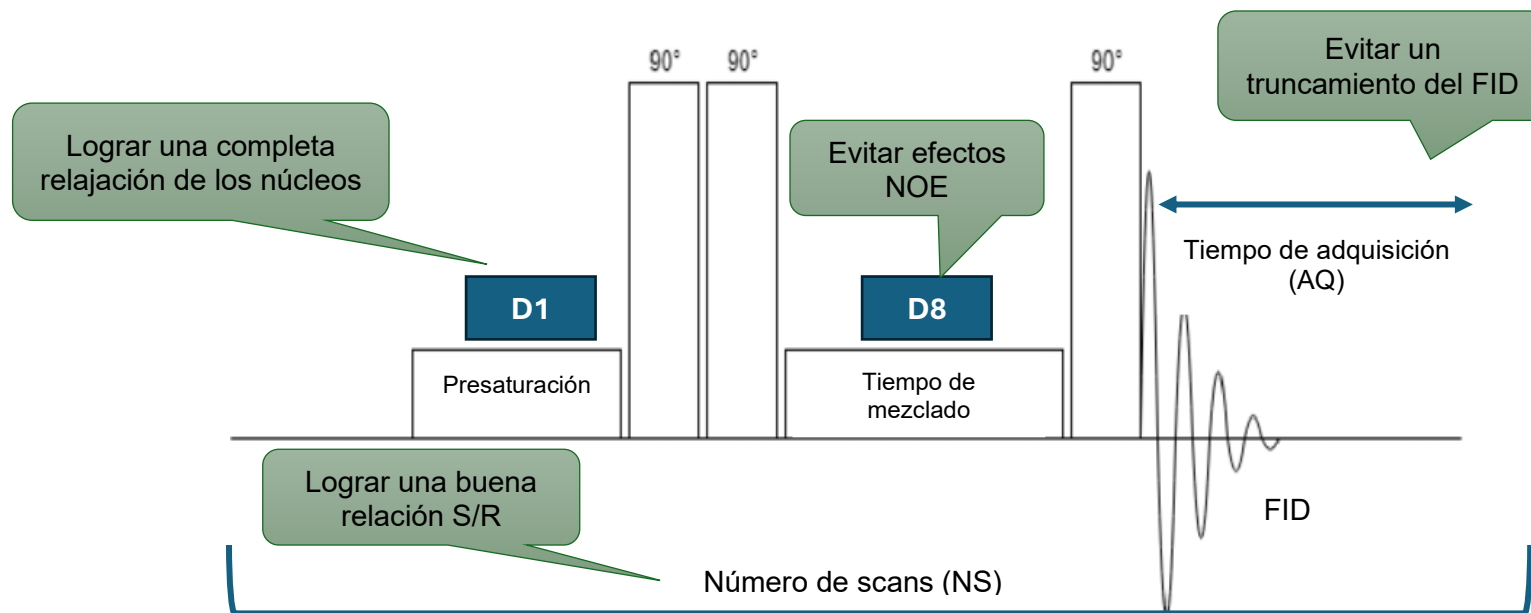


Figura 3. Esquema de la secuencia de pulsos `noesygppr1d` y los principales parámetros de adquisición .

1.4 Análisis de Reconocimiento de Pautas

1.4.1 Definición

Las técnicas espectroscópicas utilizadas en metabolómica, como la RMN y la EM, generan una gran cantidad de datos complejos. En los espectros de RMN, una sola muestra puede contener miles de datos (variables) a procesar, lo que se traduce en matrices complejas para su interpretación. El reconocimiento de pautas (RP) comprende varias herramientas matemáticas dentro de la estadística multivariante, que permiten analizar, a partir de estas matrices de datos, la información contenida en cada muestra (James N. Miller, 2002).

1.4.2 Clasificación

Los modelos de análisis multivariable se clasifican, principalmente en base a si se tiene conocimiento previo sobre los metabolitos y los grupos de interés como:

- No supervisados: no requiere conocimiento previo de las clases, ya que busca la existencia de clases para formar grupos de objetos que sean similares entre sí. Entre los más comunes se encuentran el Análisis de Componentes Principales (PCA), Análisis de conglomerados (clúster) y el Árbol de mínima dispersión.
- Supervisados: la característica principal de estos métodos es que requiere el conocimiento previo de los grupos o clases antes de comenzar el análisis. Estos se dividen en dos etapas, de

aprendizaje y de predicción. Entre los métodos más utilizados en los ámbitos analíticos se encuentran el de Mínimos Cuadrados Parciales con Análisis Discriminante (PLS-DA) y el Modelo Suave e Independiente de Analogías de Clases (SIMCA).

1.4.3 Preprocesamiento de los datos

Los datos crudos obtenidos de las diversas técnicas analíticas, ya sean espectroscópicas, gravimétricas o volumétricas, usualmente deben “limpiarse” o someterse a un preprocesamiento de datos para transformar los valores originales y adecuarlos para el procesamiento estadístico y así disminuir o evitar las variables de magnitudes diferentes o escalas distintas (Pardo Rafael, 1988).

Las etapas de preprocesamiento de datos más comunes en métodos espectroscópicos son las siguientes: alineación, agrupación, normalización, centrado y escalado de los datos (Nagana Gowda, 2021). A continuación, se describen las utilizadas en este proyecto.

- Alineación: en un espectro de RMN, las señales de desplazamiento químico son sensibles, principalmente al entorno químico, al pH de la solución y la temperatura de adquisición, entre otros. Por lo que la función de alineación busca asegurar que la misma variable corresponda al mismo metabolito en todas las muestras.
- Normalización: de forma matemática busca que todos los vectores de la matriz tengan la misma longitud, es decir, compensar las diferencias entre las intensidades de la respuesta de la variable. En metabolómica se podrían ver alteradas la intensidad de las señales debido a la

variabilidad inherente que muestran los biofluidos, debido a diversos factores, como la dieta, la genética, el metabolismo, entre otros. Esta función busca compensar esa variabilidad normalizando los datos para posteriormente comparar las muestras entre ellas. Se puede utilizar un metabolito de referencia o algoritmos de normalización espectral.

- Centrado: se basa en restar de cada variable, el valor medio de la misma. Es indispensable realizar este proceso en herramientas como el PCA, ya que el modelo podrá centrarse en evaluar las diferencias entre las muestras y no en los valores netos de las señales.
- Escalado: implica dividir todas las variables por un factor elegido para igualar la importancia de las variables.

1.4.4 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica útil para reducir la cantidad de datos generados y su utilidad sobresale cuando las variables están correlacionadas.

En el PCA se calculan los componentes principales: el primer componente principal (PC1), donde los puntos que la componen tienen la más alta varianza, y el segundo componente principal (PC2), que representa la siguiente varianza más alta en el conjunto de datos, y así sucesivamente. Se espera que los primeros PC tengan la mayor variación del conjunto de datos y los últimos contengan la menor información de los datos.

Los PCs forman ángulos rectos unos con otros, a esta propiedad se le conoce como ortogonalidad, en la figura 4 se puede observar un método cuando

solo hay dos variables y por lo tanto dos componentes principales. En el cual PC1 abarca la mayor parte de la variación y de esta manera es como se reduce la cantidad de datos al trabajar solo con una variable.

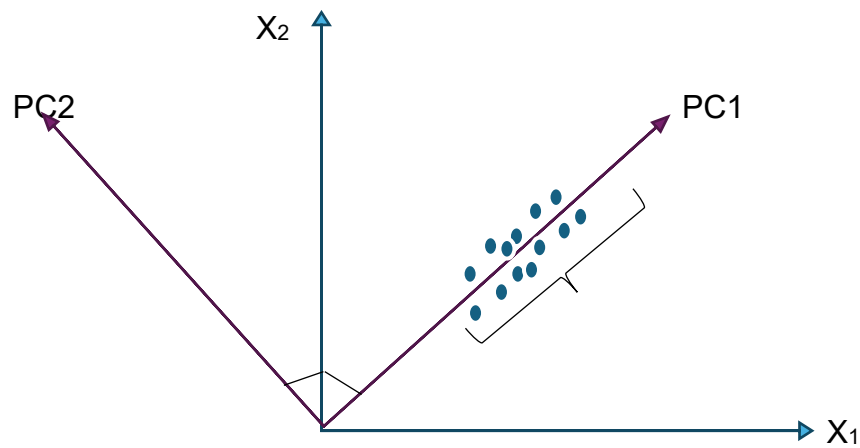


Figura 4. Diagrama de dos componentes principales, para dos variables.

De forma general el proceso para la obtención de las PCs es a partir de una matriz de datos (X) compuesta por las muestras en filas (n) y las variables en columnas (m).

Siendo una manera matemática de expresarla con la siguiente fórmula:

$$X = TP^T + E$$

X ($n \times m$): Matriz de datos iniciales

T ($n \times A$): Matriz de scores

P ($m \times A$): Matriz de loadings, $P^{(T)}$ es la transpuesta.

E ($n \times m$): Matriz de residuales que abarca la variación no explicada por los componentes A .

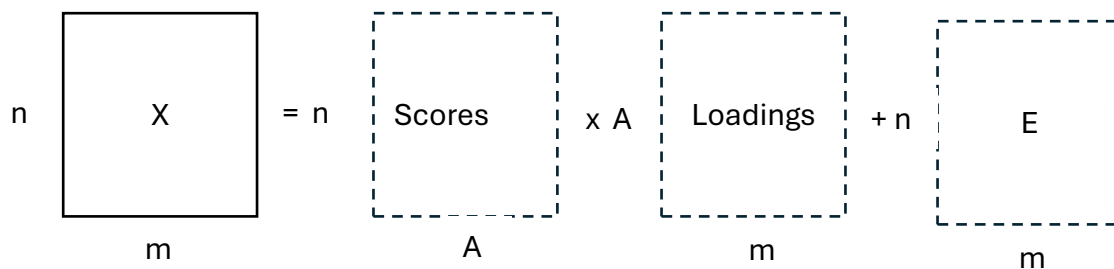


Figura 5. Descomposición matricial en componentes principales a partir de una matriz.

1.4.4.1 Representación gráfica

La visualización gráfica de los modelos de PCA se presentan como gráficos de puntuaciones (scores) y cargas (loadings).

En donde los scores (T) representan las coordenadas de las muestras en el espacio de los componentes principales, permiten ver los agrupamientos, tendencias o diferencias entre muestras y visualizar valores atípicos “outliers”.

Los loadings (P) permiten ver la contribución de cada variable a cada componente; podemos identificar qué variable es la responsable de la separación en un gráfico de scores, por ejemplo, los metabolitos que expliquen la variación de las muestras o señales características de cada grupo.

1.4.5 Mínimos Cuadrados Parciales con Análisis Discriminante

Recientemente, el PLS-DA es el método supervisado a utilizar por excelencia, ya que proporciona la reducción simultánea de la dimensionalidad de los datos y de las etiquetas de clases en el análisis.

Este método combina la extracción de características y el análisis discriminante en un solo algoritmo. Se basa en el método de regresión de mínimos cuadrados parciales éste modela la relación lineal entre conjuntos de variables observadas mediante variables latentes (Pardo Rafael, 1988). Es decir, que no solo transforma la matriz de variables X si no que añade una segunda matriz Y que cifra la pertenencia de las muestras a una clase mediante variables simulada.

$$X = TP^T + E$$

A través de diversas fórmulas matemáticas se propone maximizar la separación entre clases (Muhammad Aminu, 2020). Calculando la covarianza y la estructura de correlación de los datos que aportan mayor importancia para la diferenciación de los grupos.

En 2019, Bhinderwala y colaboradores establecieron un flujo de trabajo en metabolómica para el análisis de células y tejidos de modelos experimentales de la EP mediante el uso de plataformas analíticas como la RMN y la EM, con la finalidad de identificar potenciales biomarcadores y mecanismos de la progresión de la enfermedad, para esto utilizaron métodos de análisis multivariable (MVA) lo que les permitió reducir la dimensionalidad de los datos para comparar los grupos de estudio de manera precisa (Bhinderwala, y otros, 2019).

Otra aplicación de los MVA es en la creación de modelos estadísticos predictivos como el estudio realizado por Lucio Gtz. y colaboradores en 2022, donde demostraron la utilidad clínica y diagnóstica de la metabolómica en el desarrollo de un modelo capaz de predecir la aparición de daño renal en pacientes con diabetes tipo 2 antes de la alteración de los parámetros

bioquímicos tradicionales, usando herramientas de la quimiometría como el modelo de clasificación SIMCA y proyecciones discriminantes (Lucio-Gutiérrez et al., 2022).

1.4 Justificación

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo con alta prevalencia de origen multifactorial, en el cual el eje microbiota-intestino-cerebro podría tener un papel importante, vinculado al desequilibrio de la microbiota y la salud del huésped.

El estudio del perfil metabolómico fecal podría permitir explorar esta relación, por ello es necesario desarrollar un método por ^1H -RMN que establezca dicho perfil, en un modelo murino de enfermedad de Parkinson, en comparación con un grupo control, con la finalidad de establecer las diferencias entre ambos.

1.5 Hipótesis

Existe una diferencia en los perfiles metabolómicos de las heces de ratón entre los grupos de estudio.

1.6 Objetivo General

Desarrollar un método por resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) para obtener y comparar, mediante análisis estadístico multivariable, el perfil metabolómico de heces de un modelo murino de enfermedad de Parkinson.

1.8 Objetivos Específicos

1. Establecer los parámetros de adquisición y procesamiento necesarios para la obtención de espectros por ^1H -RMN de heces de ratón.
2. Obtener los perfiles metabolómicos de heces de ratón del grupo control y del modelo murino de enfermedad de Parkinson.
3. Comparar los perfiles metabolómicos por medio de análisis multivariable de reconocimiento de pautas.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Reactivos

- Agua MilliQ
- Buffer PBS (Buffer de fosfatos salino) 10x Grado molecular, pH 7.4 ± 0.1, Corning
- Metanol deuterado (CD_3OD), 99.8% átomos de D, Sigma
- Óxido de deuterio (agua deuterada, D_2O), 99.9 % átomos de D, con 0.75 % p/v de ácido 2,2,3,3 – tetradeutero – 3- (trimetilsili)- propiónico (TSP), Sigma

2.2 Equipos

- Agitador vórtex Maxi Mix II modelo 37,600, Thermolyne
- Balanza analítica modelo PA214C, Pioneer
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Avance III HD 400 MHz equipado con una sonda SP BBO de 5 mm con gradientes de campo en Z, Bruker
- Microcentrífuga, miniSpin plus

- Microcentrífuga modelo D1008, DLAB
- Potenciómetro modelo Starter 3100, OHAUS
- Ultracongelador modelo RLE30086A, Thermo Scientific
- Sonificador modelo 1510, Branson

2.3 Materiales

- Espátulas
- Guantes
- Gradillas para tubos cónicos
- Pipetas automáticas de volumen variable (2- 20, 20 – 200 y 100 – 1000 μ L), Thermo Scientific
- Puntillas de plástico de 2- 20, 20 – 200 y 100 – 1000 μ L
- Tubos cónicos de plástico de 1.5 y 2.0 mL
- Tubos de RMN estándar de 5 mm x 7 pulgadas, Bruker

2.4 Programas de cómputo

- Matlab R2024a, The MathWorks
- PLS_Toolbox 9.3.1, Eigenvector Research
- TopSpin versión 3.8.1, Bruker

2.5 Muestras biológicas

2.5.1 Obtención de las muestras

Para establecer las condiciones de adquisición y procesamiento necesarios en la obtención de espectros de protón se utilizaron muestras de heces de ratones sanos que fueron colectadas diariamente, obteniéndolas directamente del animal, de 2-4 pellets en tubos cónicos estériles de 1.5 mL. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz - oscuridad de 12 horas, con libre acceso a alimento Prolab RMH 2500 (5P14, LabDiet, St. Louis, MO) y agua.

2.5.2 Obtención de las muestras de estudio

Se utilizaron las muestras recolectadas por el grupo de trabajo del departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL del modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

Nos fueron proporcionadas 28 muestras de heces de ratón macho del modelo animal C57BL/6J de la enfermedad de Parkinson inducido con PQ. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz - oscuridad de 12 horas, con libre acceso a alimento y agua.

Las muestras fueron reunidas de la siguiente manera: a partir del grupo control inyectado con PBS y del grupo experimental inyectado con PQ, conformados por 3 sujetos cada uno, se colectaron de 2-3 pellets fecales en tubos cónicos estériles de 1.5 mL, por sujeto, por semana y se almacenaron a -80°C.

2.6 Desarrollo de las condiciones de extracción

Se desarrolló el siguiente método para evaluar las condiciones óptimas para la mayor extracción de metabolitos de muestras fecales por ^1H -RMN.

2.6.1 Evaluación del efecto de la dilución

Los protocolos reportados en la literatura para la extracción de las muestras de materia fecal en estudios de metabolómica son muy variados, sin embargo, coinciden de forma general en la dilución de la muestra en proporciones de 1:2 a 1:10 %p/v de disolvente con la cantidad de muestra pesada. El disolvente más utilizado es una solución amortiguadora de fosfatos en solución salina a pH de 7.4, a la cual se le adiciona, al menos un 10% de óxido de deuterio (D_2O) con estándar interno para referenciar los espectros, siendo el más común el ácido 3-(trimetilsilil) propiónico. Se homogeniza la muestra en agitación por vórtex y posteriormente se centrifuga para obtener el sobrenadante y colocarlo en un tubo de RMN (Silke Matysik, 2016).

Se pesaron en balanza analítica 50, 100 y 150 mg de la mezcla de heces de ratones sanos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se les añadió un volumen de 700 μL de PBS pH 7.4 μL (conteniendo 10% de D_2O con 0.75% TSP), resultando en una relación peso – volumen de 1:14, 1:7 y 1:4. Posteriormente se homogenizó la muestra mediante agitación en vórtex durante 2 minutos para después sonicar la disolución durante 10 minutos y centrifugar a 10,000 RPM durante 10 minutos para obtener el sobrenadante, este procedimiento se realizó

por duplicado. Se tomó una alícuota de 550 μ L y se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm.

La obtención de los espectros se realizó conforme a los parámetros de adquisición descritos en el apartado 2.6.3. Los espectros fueron preprocesados de forma individual a partir de los FIDs obtenidos de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 2.6.4

2.6.2 Selección del disolvente de extracción

Se preparó una mezcla o “pool” de muestras de heces de ratones sanos y a partir de este pool, se pesaron en una balanza analítica, 100 mg de muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le añadieron 700 μ L de los disolventes a evaluar; buffer de fosfatos en solución salino con pH ajustado de 7.4 a una concentración de 10 mM (PBS 1X) con 10% de D₂O (0.75% v/v de TSP), PBS con metanol deuterado en proporción 1:1 (PBS:CD₃OD). Posteriormente se homogenizó la muestra mediante agitación en vórtex durante 2 minutos para después sonicar la disolución por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar la disolución a 10,000 RPM durante 10 minutos para obtener el sobrenadante, este procedimiento se realizó por duplicado. Se tomó una alícuota de 550 μ L y se transfirió directamente a un tubo de RMN de 5 mm.

Los espectros de ¹H-RMN fueron obtenidos en el espectrofotómetro de RMN Bruker de 400 MHz, bajo las condiciones de adquisición mostradas en la tabla 2.

Los FIDs fueron preprocesados con el software TopSpin 3.8, realizando la corrección de fase y el ajuste de línea base, así como el ajuste del desplazamiento químico con la señal del disolvente, TSP a 0.00 ppm.

2.6.3 Adquisición de los parámetros instrumentales

Para la evaluación de los parámetros de adquisición y procesamiento se prepararon tres muestras de heces de ratones sanos de la siguiente forma: a partir de un “pool” o mezcla de muestras de 5 días, se pesaron en una balanza analítica 100 mg de la mezcla de la muestra en un tubo cónico de plástico de 1.5 mL y se añadieron 700 μ L de PBS (pH=7.4) con 10% de D₂O. Posteriormente se homogenizó la disolución mediante agitación por vórtex durante 2 minutos, seguido de sonicación por 10 minutos. A continuación, para obtener el sobrenadante se centrifugó la disolución a 10,000 RPM durante 10 minutos. Se tomaron 550 μ L del sobrenadante que fueron transferidos a un tubo de RMN de 5 mm.

Estas disoluciones se analizaron a temperatura controlada de 25°C en un espectrómetro de RMN de 400 MHz con una sonda BBO de 5 mm con gradientes de campo en Z, Bruker. Se obtuvieron los espectros de ¹H-RMN, utilizando una secuencia de pulsos para supresión de agua, noesygppr1d. En la tabla 2 se muestran los parámetros de adquisición.

Tabla 2. Parámetros para la adquisición de los espectros de ^1H -RMN con la secuencia de pulsos noesygppr1d.

Parámetro de adquisición	Valor
Ángulo de giro	90°
Tiempo de adquisición (AQ)	5.45 s
Ventana espectral (SW)	15 ppm
Número de puntos (TD)	65,536

Además, se evaluaron diferentes valores del valor de la ganancia del receptor, el tiempo de pulso y el número de scans, que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de los parámetros de adquisición a optimizar.

Número de scans (NS)	Tiempo de mezclado D8 (s)	Tiempo de retardo D1 (s)	Ganancia del receptor (RG)
128	0.01	2	64
256	0.05	4	128
512	0.10	5	203

2.6.4 Parámetros de procesamiento de los espectros

En todos los espectros, al obtener el FID, se procesó inicialmente con la multiplicación por un valor de 0.1 Hz de ensanchamiento de línea exponencial, antes de la Transformada de Fourier (FT). El ajuste de fase se hizo manualmente,

referenciando con la señal singulete de TSP, en el desplazamiento químico de 0.00 ppm. La corrección de la línea base se realizó con el comando ABSN. El procesamiento y corrección se realizaron con el software TopSpin 3.8.

2.6.5 Evaluación de la precisión

Una vez definidos los mejores parámetros de adquisición de los espectros se evaluó la precisión intradía e interdía. Para este ensayo se preparó un pool de muestras de heces de ratones sanos y se pesaron alícuotas de 100 mg del mismo pool homogéneo (n=9) preparadas de forma independiente, durante 3 días no consecutivos, siguiendo el tratamiento de muestra previamente descrito, y se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN bajo las condiciones descritas en la sección 2.6.

Se determinó calculando el %DER con la ecuación 2, de las áreas de tres señales elegidas del espectro.

$$\%DER = \left(\frac{s}{x} \right) (100) \quad \text{Ecuación 2}$$

s = desviación estándar

x = promedio

2.6.6 Evaluación de la exactitud

La exactitud se determinó mediante un ensayo de recuperación con el objetivo de evaluar la eficiencia del tratamiento de la muestra.

Este ensayo se realizó mediante el método de adición estándar. A partir de las heces de ratones sanos se realizó una mezcla de muestra de al menos 5 días consecutivos, se pesaron 100 mg de muestra (n=6), dos alícuotas se analizaron sin adición del estándar y a cuatro alícuotas se añadieron 15µL de una solución stock de fenilalanina al 225 mM, la muestra se dejó reposando durante 20 min a 4°C, la extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.6.3 utilizando PBS 1x con pH 7.4 (10% de D₂O con 0.75 v/v de TSP) como disolvente para la extracción. Se transfirieron 550µL del sobrenadante en un tubo de RMN de 5 mm para su análisis. Una vez obtenida la respuesta se calcula el % de recuperación con la ecuación 3 adaptada de ICH Q2 para ensayos sobre matrices complejas.

$$\% \text{ recuperación} = \left(\frac{\text{Respuesta observada} - \text{Respuesta sin adicionar}}{\text{Respuesta esperada}} \right) (100) \quad \text{Ecuación 3}$$

2.6.7 Evaluación de la robustez

Para evaluar el impacto de variables en el proceso de adquisición espectral sobre la respuesta analítica, se realizó un diseño de experimentos de Plackett-Burman. Si se evalúan tres variables independientes, se requiere un mínimo de cuatro corridas experimentales (k=3), ya que requiere un mínimo de k + 1 = N (ya que N debe ser múltiplo de 4). En este caso de tres factores, el diseño es matemáticamente equivalente a un diseño factorial fraccionado 2³⁻¹ con tres puntos centrales.

Los factores evaluados fueron la cantidad de volumen de disolvente, la temperatura de adquisición y el valor del tiempo de mezclado (D8). Cada variable se modificó en dos niveles: bajo y alto, y en los tres puntos centrales, descritos en la tabla 4.

Para evaluar la significancia estadística de los efectos, se procesaron los datos mediante un programa de libre acceso para construir los gráficos de coeficientes y el diagrama de Pareto.

Tabla 4. Diseño de experimentos de Placket – Burman (factorial fraccionado 2^{3-1}).

Orden de experimento	Volumen de PBS (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Valor de D8 (s)
1	698	26	0.04
2	700	25	0.05
3	702	26	0.06
4	698	24	0.06
5	702	24	0.04
6	700	25	0.05
7	700	25	0.05

2.6.8 Obtención de los perfiles metabolómicos del modelo murino de EP

Se estableció la división de las muestras de heces recolectadas del protocolo previamente descrito, de la siguiente forma: se mezclaron las muestras obtenidas de la semana 0 y 1 del ensayo, respetando las muestras por individuo,

la siguiente mezcla de muestras abarcó las heces recolectadas de las semanas 6 y 7 semanas. Se pesaron 100 mg de la muestra homogenizada en una balanza analítica en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL.

Cada muestra se trató conforme al procedimiento establecido en la sección 2.6.3 con los parámetros de adquisición de la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de adquisición de los espectros de ^1H -RMN noesygppr1d.

Parámetro de adquisición	Valor
Ángulo de giro	90°
Tiempo de adquisición (AQ)	5.45 s
Ventana espectral (SW)	15.02 ppm
Número de puntos (TD)	65,536
Temperatura	25°
Número de scans	256
Ganancia del receptor	203
Tiempo de retardo (D1)	5.0 s
Tiempo de mezclado (D8)	0.05

2.6.9 Procesamiento de los espectros

Todos los espectros obtenidos fueron procesados de forma individual usando el programa TopSpin 3.8, Bruker. A partir del FID, se usaron los siguientes comandos: LB de 0.1, EM, FT, seguido de la

corrección manual de la fase y normalización de línea base con el comando ABSN.

2.7 Análisis Quimiométrico

A partir de cada uno de los espectros de ^1H -RMN obtenidos y procesados de forma individual de los perfiles metabolómicos se exportaron en formato JCAMP-DX desde el programa TopSpin 3.8, Bruker.

2.7.1 Preprocesamiento de los datos

Para el preprocesamiento estadístico de los datos contenidos en los espectros se utilizó el programa Matlab y con el paquete estadístico PLS-Toolbox. Los datos en formato JCAMP-DX fueron importados en el programa aplicando el comando `jcampreadr` para convertir los espectros de RMN a matrices matemáticas con el algoritmo para el arreglo de datos. Se construye la matriz de datos, ordenando las muestras en filas y las variables en columnas, en este caso, cada señal del espectro de ^1H -RMN.

En la etapa de preprocesamiento espectral anterior al análisis multivariable, se identificaron las áreas que no aportan información importante y se eliminaron, cortando los extremos del espectro donde no se observan señales además del área donde se realizó la supresión de la señal del agua (alrededor de 4.7 ppm). Después se procede con la alineación para corregir pequeñas variaciones en los espectros, la agrupación para reducir la dimensionalidad de

los datos, así como la normalización de los espectros para disminuir la variación producida por las diferencias entre las concentraciones totales de los metabolitos, es decir la variación inherente que tienen las muestras biológicas, y el escalado de los datos para ajustar la importancia de las variables. Terminado el procesamiento espectral bioestadístico se procedió a evaluar los espectros en los modelos de análisis de reconocimiento de pautas.

2.7.2 Análisis de componentes principales

El modelo de PCA fue aplicado para explorar la formación de agrupamientos entre muestras e identificar las variables que diferencian los grupos. La validación del modelo se realizó mediante validación cruzada.

Se elaboró el gráfico de score para visualizar las agrupaciones formadas entre las muestras, así como para observar, de existir, valores atípicos o tendencias entre los datos. Mientras que el gráfico de loadings se utilizó para observar e identificar los “bins” en este caso las señales que influyen en la separación de los grupos.

2.7.3 Mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante

Como análisis supervisado se realizó el PLS-DA, como su nombre lo dice, se utiliza la regresión de mínimos cuadrados que permitirá hacer la separación entre las clases. Después del preprocesamiento de los datos, se construyó la matriz (y), donde se identifican las etiquetas de clase de las muestras de estudio. Se identificaron las variables latentes que maximicen la separación entre los

grupos definidos, en este caso, grupo control (-) y grupo experimental (+). El modelo identificó las variables que mejor predicen y explican la separación entre los grupos definidos en Y.

2.7.4 Evaluación de los modelos de análisis de reconocimiento de pautas

Para evaluar la validación de los diferentes modelos de análisis de RP se utilizan las “figuras de mérito”, usadas para determinar la calidad y el rendimiento de modelos. Por ejemplo, en el modelo de regresión se genera un parámetro de R^2 , que indica la capacidad de ajuste o varianza explicada por el modelo, y debe ser un valor cercano a 1 para ser considerado adecuado. Entre otras métricas que se pueden calcular se encuentran: Q^2 , análisis de varianza cruzada, curvas ROC, etc.

Se calcularon, para los modelos de regresión, los errores cuadráticos y los errores de clasificación. El MSE, cuantifica la diferencia cuadrática promedio entre los valores observados y los valores predichos por el modelo. El error de clasificación mide la proporción de las observaciones que el modelo ha asignado incorrectamente a un grupo.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS.

3.1 Evaluación del efecto de la dilución

Con el fin de determinar la relación p/v de la masa con disolvente, se prepararon extractos evaluando tres cantidades distintas de heces de ratón: 50 mg, 100 mg y 150 mg. Todas las muestras fueron procesadas de manera estandarizada en un volumen final de 700 μ L de PBS con un 10% de D₂O. Los espectros de ¹H-RMN fueron adquiridos aplicando los mismos parámetros instrumentales propuestos inicialmente en la tabla 5. En la figura 6 se observan los espectros superpuestos donde el espectro de color azul fue adquirido con 150 mg de muestra, el espectro de color rojo con 100 mg y el espectro de color verde con 50 mg.

Al comparar los espectros obtenidos en la figura mostrada debajo observamos de forma general un aumento lineal de la intensidad de las señales conforme aumenta la cantidad de muestra utilizada. Es decir, se observa un gran efecto de dilución en el espectro obtenido con 50 mg de muestra, pudiéndose perder las señales de los metabolitos presentes en baja concentración. Al ampliar una región a campo alto del espectro donde se observan señales muy juntas,

podemos observar que el espectro obtenido con 150 mg de muestra presenta distorsión en la línea base y ensanchamiento de la forma de las señales (figura 6). El espectro obtenido con 100 mg de muestra presenta la mejor relación S/R permitiendo una correcta visualización de las señales a lo amplio del espectro, por lo cual se estableció 100 mg de heces de ratón como la cantidad necesaria para el establecimiento de las siguientes condiciones de tratamiento de muestra e instrumentales.

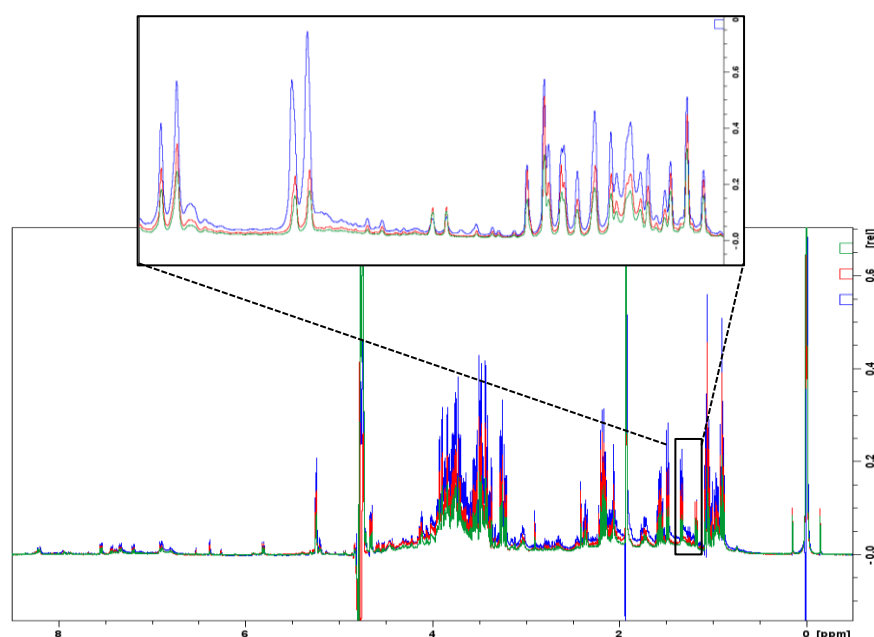


Figura 6. Espectros de ¹H-RMN obtenidos con diferente cantidad de muestra a partir de un mismo pool de heces de ratón sano. El espectro en color azul corresponde a una masa (m) = 150 mg, en color rojo m = 100 mg y en color verde m= 50 mg.

3.2 Selección del disolvente de extracción

El siguiente paso en el establecimiento del método para la obtención de los perfiles metabolómicos es elegir el disolvente de extracción. Para este punto se procesaron muestras individuales a partir del mismo pool de muestra usando buffer de fosfatos con 10% de D₂O, metanol deuterado y una mezcla de ambos disolventes en proporción 1:1, adquiriendo los espectros bajo las mismas condiciones instrumentales.

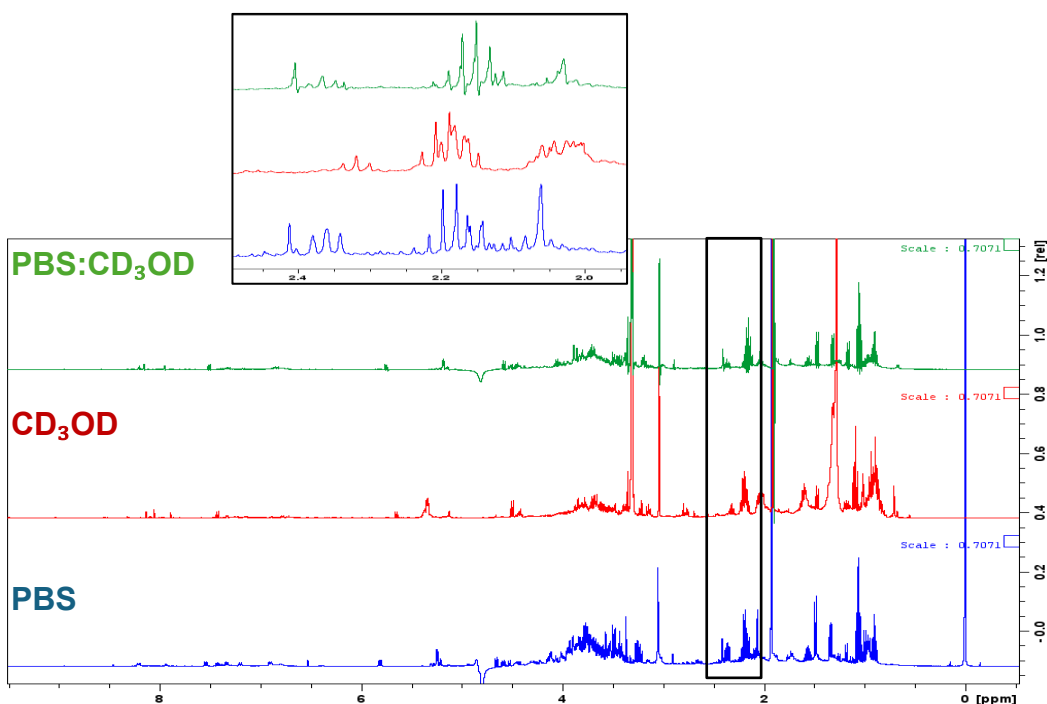


Figura 7. Espectros de ¹H-RMN de muestras de heces de ratón sano extraídas con tres disolventes diferentes (PBS:CD₃OD 1:1 en color verde, CD₃OD en color rojo, PBS 1x (10% D₂O) en color azul).

De forma general podemos observar en la figura 8 que se sigue un patrón de señales característico en los tres extractos con un ligero cambio en el

desplazamiento químico de algunas señales debido al ambiente químico del disolvente. Con un ligero decaimiento de la señal en el espectro obtenido con la mezcla de disolventes, lo que podría deberse a un proceso instrumental debido a las interacciones de los disolventes y a un ajuste incompleto de los shimming.

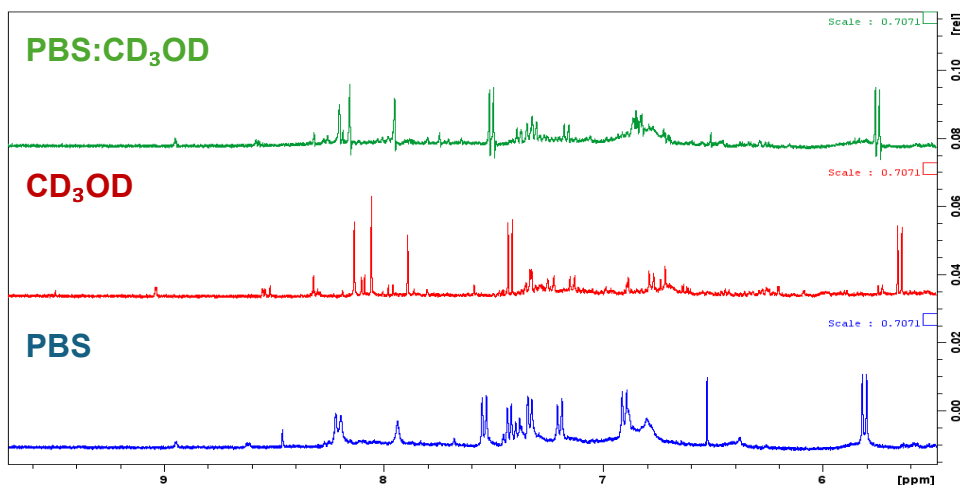


Figura 8. Ampliación en la región a campo bajo de los espectros de ^1H -RMN de muestras de heces de ratón sano extraídas con tres disolventes diferentes (PBS:CD₃OD 1:1 en color verde, CD₃OD en color rojo, PBS 1x (10% D₂O) en color azul).

3.3 Parámetros de adquisición y procesamiento

3.3.1 Determinación del número de scans

Para establecer el número de scans para la adquisición de los espectros de ^1H -RMN se utilizó una muestra problema a partir de un pool de heces de ratón sano siguiendo el tratamiento de las muestras descrito en la sección 2.4.5 En la figura 8 se muestran los espectros superpuestos adquiridos con diferente número

de scans, siendo el espectro en color azul el obtenido con NS = 512, el espectro en color rojo con NS=256 y el espectro en color verde con NS=128.

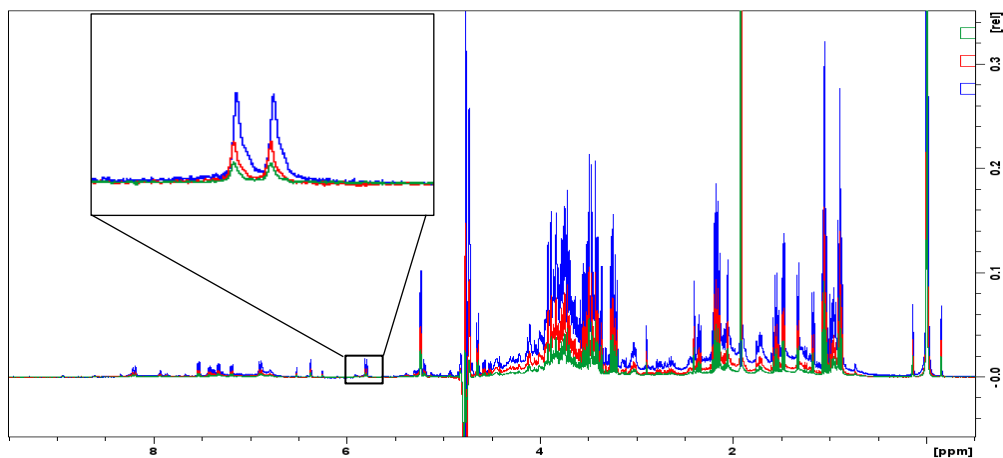


Figura 9. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distinto valor de NS, mostrando una ampliación a 5.8 ppm.

En este punto, se eligió 256 como el número de scans para la obtención de los siguientes espectros, debido a que presentó la mejor relación señal - ruido y requirió un menor tiempo de uso de equipo.

3.3.2 Evaluación del tiempo de mezclado

Los espectros para la determinación del tiempo de mezclado fueron obtenidos a partir de una muestra problema de heces de ratón sano, tratada siguiendo lo descrito en el apartado 2.6.3. En la figura 10 se observan los espectros superpuestos mostrando el área de la supresión de la señal de agua alrededor de 4.7 ppm. El espectro en color azul corresponde a un $D_8 = 0.10$ s, rojo $D_8 = 0.05$ y verde $D_8 = 0.01$.

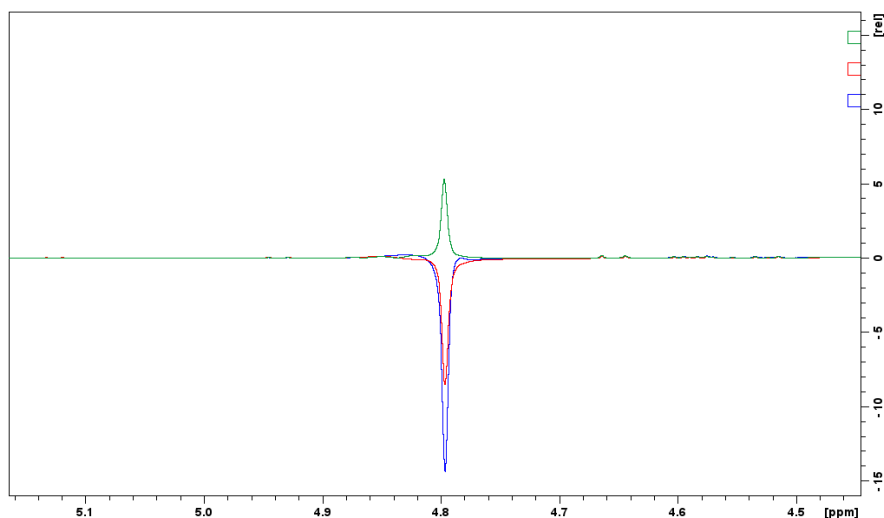


Figura 10. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distinto valor de D8 (s), mostrando el área de la supresión de la señal de H_2O .

En el espectro obtenido con un $\text{D8} = 0.01$, señalado en color verde, se observa que la señal de supresión de agua es positiva indicando que no se obtuvo una correcta supresión de la señal. En los espectros obtenidos con D8 igual a 0.05 y 0.10 s se ilustra la señal negativa de la supresión de agua de forma muy similar; en este caso se eligió 0.05 segundos como el valor de D8 logrando una correcta supresión de agua, evitando un tiempo prolongado que podría provocar efectos de magnetización residual en las señales.

3.3.3 Evaluación del tiempo de relajación

Para obtener los espectros modificando el tiempo de relajación (D1), se empleó una disolución de la muestra de heces de ratón en proporción 1:7 p/v con PBS 1x a pH 7.4 (10% de D_2O). Se evaluaron diferentes valores para el tiempo de relajación (D1) utilizando 2, 4 y 5 segundos, cuyos espectros se muestran en

la Figura 11. Para apreciar con mayor claridad el efecto del D1, se incluye una ampliación de una señal en la región de los aromáticos (6.5 a 8.5 ppm); se identifican en color azul, verde y rojo para representar los tiempos de 2, 4 y 5 segundos, respectivamente. Donde se observa que a un mayor tiempo de relajación se genera una señal más intensa, por otro lado, el valor de tiempo de relajación de 2 segundos muestra señal menos intensa. Si bien la intensidad de señal entre 4 y 5 segundos es similar, se eligió un tiempo de 5 segundos como el valor de D1 para la obtención de los siguientes espectros, debido a que se asegura una relajación completa de los núcleos atómicos en la muestra sin afectar el tiempo de análisis de manera drástica.

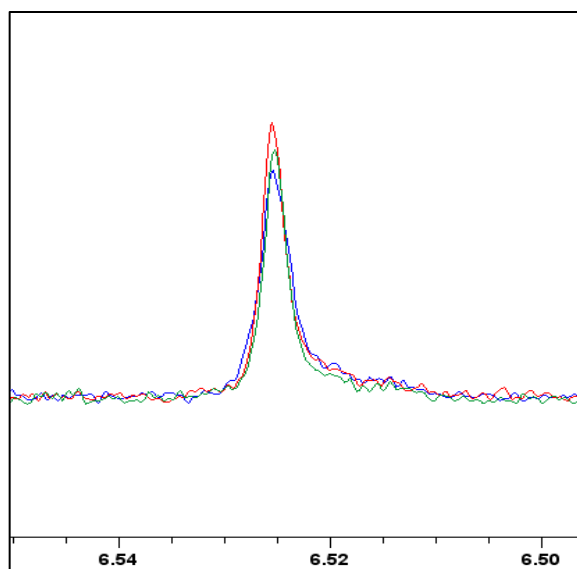


Figura 11. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con diferente tiempo de D1, el color azul corresponde a 2 s, el color verde a 4 s y el color rojo a 5 s.

3.3.4 Evaluación del tiempo de adquisición

Para determinar el valor adecuado del tiempo de adquisición sin aumentar innecesariamente el tiempo de análisis y detectando la señal del FID sin interrupción, se obtuvieron los espectros con diferentes tiempos, AQ= 1.7, 2.7 y 5.4 segundos (Fig. 12). Se determinó un tiempo de 5.4 segundos como el valor óptimo en el que ocurre una relajación completa de la señal del FID, una línea base estable en los espectros y señales sin distorsión (Fig.13).

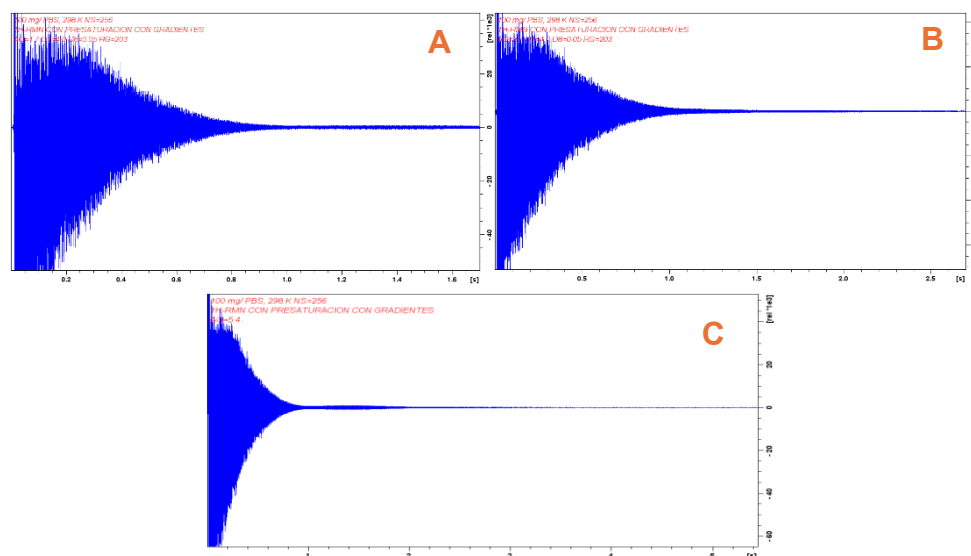


Figura 12. Gráfico de los FID obtenido a partir de una muestra problema. El inciso a) obtenido con AQ=1.7 s, b) obtenido con AQ=2.7 s, c) obtenido con 5.45 s.

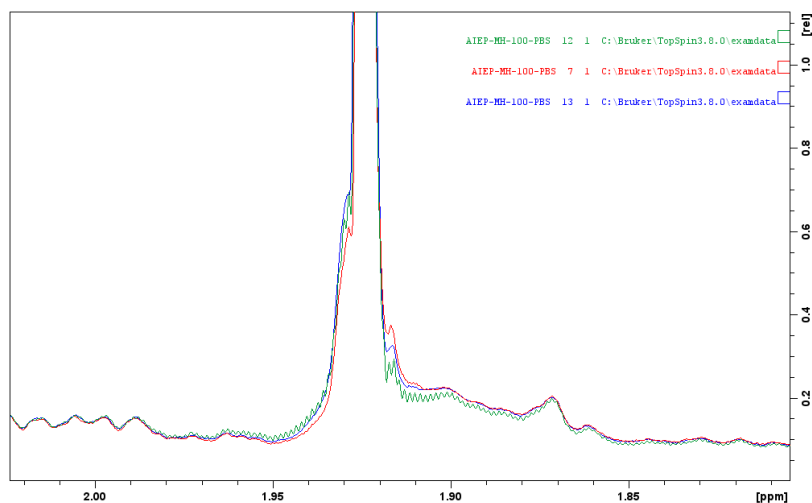


Figura 13. Espectros de ^1H -RMN obtenidos con distinto valor de AQ, siendo el color azul AQ=5.45, el color rojo AQ= 2.7 y en color verde AQ=1.7.

3.3.5 Evaluación de la ganancia del receptor

Para determinar el valor correcto de la ganancia del receptor para la obtención de los espectros de ^1H -RMN, se modificó el RG con los valores propuestos (RG= 64, 128 y 203) al obtener los espectros de una muestra representativa de heces de ratón sano 1:7 p/v en PBS 1x pH=7.4 (10% de D_2O). Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observan superpuestos los espectros, correspondiendo el espectro en color azul con un RG de 203, el espectro en color rojo con un RG de 128 y el espectro en color verde con un RG de 64.

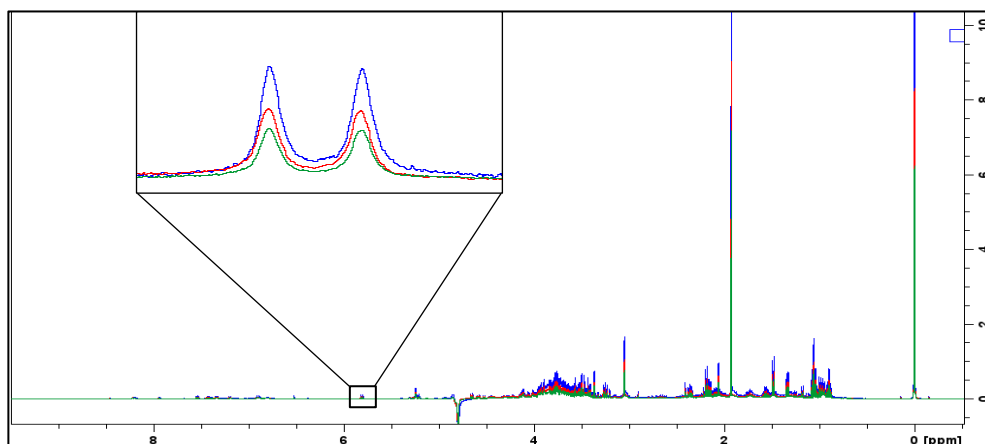


Figura 14. Espectros de ^1H -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, de una muestra de heces de ratón sano. El espectro azul corresponde a un valor de RG = 203, en color rojo un RG=128 y en color verde un RG= 64.

Se eligió un valor de RG=203 para la obtención de los perfiles metabolómicos debido a que la señal de los analitos menos abundantes se intensifica de forma considerable como se observa en la figura 14, manteniendo la forma de la señal sin mostrar indicios de saturación del detector.

3.3.6 Condiciones de procesamiento

Una vez obtenido el FID de cada espectro se procesó aplicando un ensanchamiento de línea (LB) con un factor de 0.1 Hz. Posteriormente se utilizó el comando *efp*, el cual realiza tres acciones de manera simultánea: el valor de multiplicación exponencial (EM) con LB, la transformada de Fourier (FT) y una corrección de fase (pK) automática. De esta manera se obtuvo el espectro al cual de forma manual se le realizó un ajuste de fase manual con corrección de orden

0. Como siguiente paso, se aplicó el comando ABSN para la corrección de la línea base y, por último, los espectros se calibraron con la señal de TSP en un desplazamiento químico en 0 ppm.

3.4 Evaluación de la precisión

La tabla 6 muestra los valores de %DER calculados a partir del área de las señales integradas en los espectros obtenidos el mismo día para evaluar la precisión intradía del método. En la figura 15 se muestra un espectro representativo de una de las replicas analizadas, con las señales elegidas a lo largo del espectro para determinar la integración y calcular el %DER.

Tabla 6. Valores obtenidos de %DER para la precisión intradía.

Señal (ppm)	%DER
1.4	6.16 %
5.2	4.23 %
7.5	9.38%

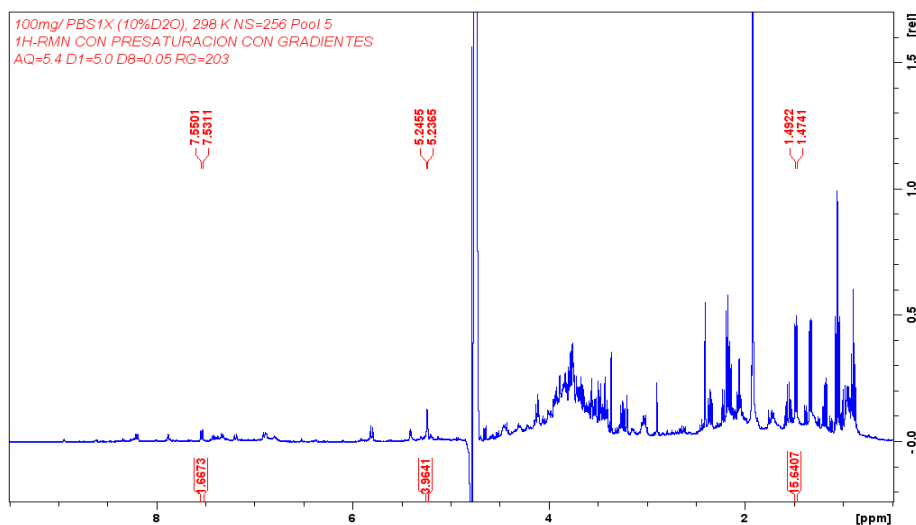


Figura 15. Espectro representativo para la evaluación de la precisión con las señales elegidas, su desplazamiento químico e integración.

En la tabla 7 se resumen los valores de %DER calculados a partir de las áreas de las señales integradas en los espectros de los replicados de muestras, obtenidos en días no consecutivos, para evaluar la precisión intermedia del método.

Tabla 7. Valores obtenidos de %DER para la precisión interdía por cada señal seleccionada.

Día	%DER		
	1.4 ppm	5.2 ppm	7.5 ppm
1	6.16%	4.23%	9.3%
2	13.50%	1.88%	6.03%
3	7.17%	2.43%	11.66%

Se observan valores de %DER entre 4.23 y 11.66% en los tres no consecutivos analizados.

3.5 Evaluación de la exactitud

Para evaluar la exactitud empleando el método de adición estándar se seleccionó una sustancia conocida que al menos tuviera una señal sin superposición otros señales de otros metabolitos observados en los espectros obtenidos previamente en la selección del disolvente de extracción. Se contempló un tamaño de muestra total de seis réplicas independientes (n=6), a las que a cuatro de estas muestras les fue añadido 15µL de una solución stock de fenilalanina al 225 mM, las muestra adicionadas se dejaron reposando durante 20 min a 4°C, la extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.6.3 utilizando PBS 1X con pH 7.4 (10% de D₂O con 0.75 v/v de TSP).

Se transfirieron 550µL del sobrenadante en un tubo de RMN de 5 mm para su análisis. En la figura 16 se observan los espectros sobrepuestos de las muestras sin adicionar (rojo) y la misma muestra adicionada con estándar de fenilalanina (15 µL, azul).

Una vez procesadas las muestras y obtenidas las respuestas instrumentales correspondientes, el porcentaje de recuperación (%R) se calculó utilizando la ecuación recomendada por la guía ICH para estudios de adición en matrices complejas (Tabla 8).

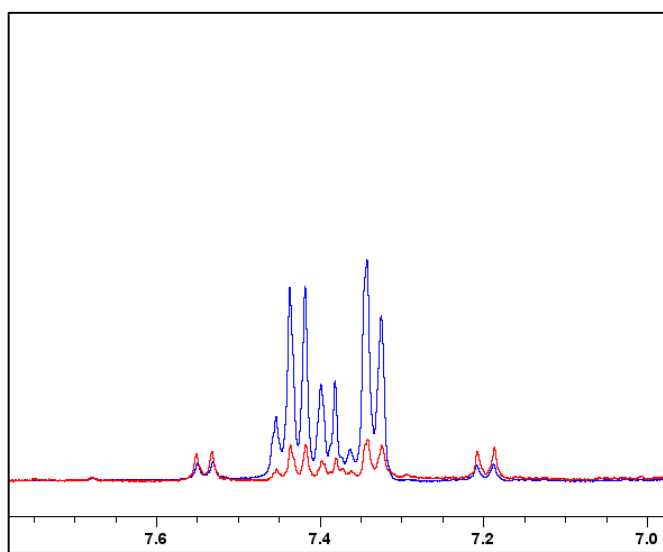


Figura 16. Espectros sobrepuestos de muestra de sin adicionar (rojo) y adicionada con fenilalanina (azul).

Para evaluar la eficiencia de extracción en la matriz, se utilizó fenilalanina como analito representativo, obteniendo recuperaciones del 73-78% y un DER de 2.87%. Aunque estos valores confirman la estabilidad en el pretratamiento de las muestras, al estar evaluando un perfil metabolómico no dirigida del análisis no demuestra la exactitud del perfil completo a partir de un solo estándar. Por

ello, este ensayo se reporta como una estimación metodológica de recuperación puntual, reconociendo que cada metabolito del perfil tiene su propio comportamiento de extracción.

Tabla 8. Porcentajes de recuperación de las muestras adicionadas.

% Recuperación
74
78
73
76
DER:2.87%

3.6 Evaluación de la robustez

Para evaluar la robustez del método se desarrolló un diseño de experimentos. Se calcularon los parámetros de coeficiente de determinación y de predicción (R^2 y Q^2), así como el análisis de varianza con valor de significancia de 0.05 y los gráficos correspondientes para representar el efecto de las variables estudiadas (volumen del disolvente, temperatura de adquisición y el tiempo de mezclado) sobre la respuesta analítica. En la tabla 9 se muestra el resumen de los resultados estadísticos para tres señales de los espectros obtenidos y en la figura 17 un espectro representativo.

Tabla 9.Resultados estadísticos del diseño experimental.

	Señal 1.4 ppm	Señal 5.2 ppm	Señal 7.5 ppm
R² ajustado	0.6545	0.2564	0.6017
Q²	-3.0747	-3.48	-0.8008
Valor de p (nivel de confianza 95%)	No significativo	No significativo	No significativo(excepto la variación del volumen)

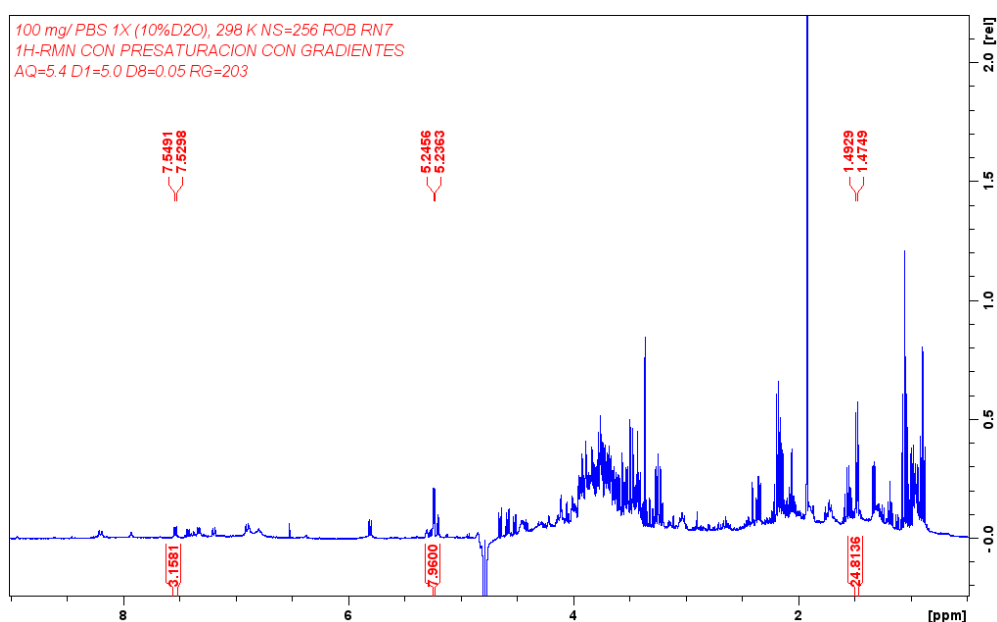


Figura 17. Espectro obtenido en el experimento no. 7 del diseño de experimentos y la integración para las señales seleccionadas.

Además, en la figura 18 se muestra de forma representativa el gráfico de coeficientes con su barra de error para los tres factores evaluados sobre la respuesta en la señal a 5.2 ppm, donde el efecto de estas variables no es estadísticamente significativo.

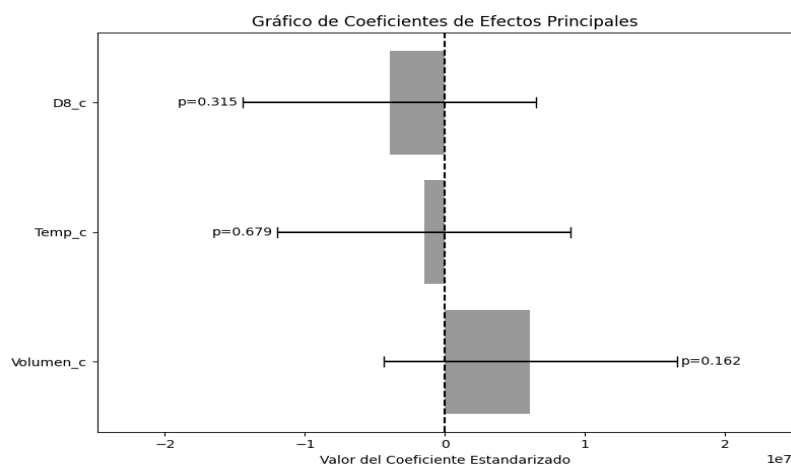


Figura 18. Gráfico de coeficientes de efectos principales para la señal a 5.2 ppm.

En la figura 19 se muestra el diagrama de Pareto que muestra que ninguno de los factores evaluados supera el límite crítico (t de student), por lo que las modificaciones evaluadas no tienen un impacto significativo sobre la respuesta detectada.

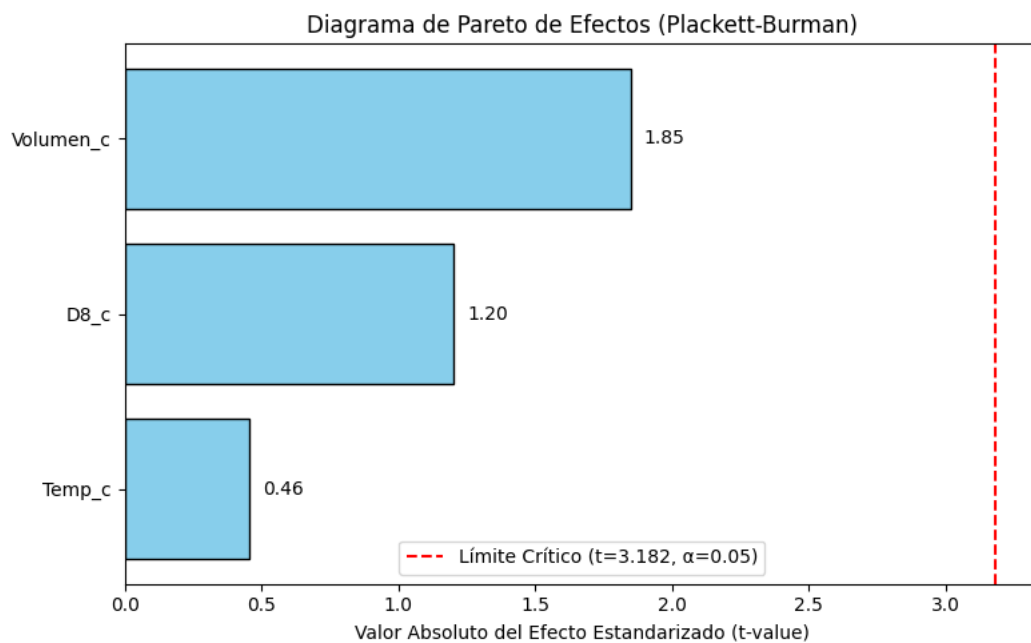


Figura 19. Diagrama de Pareto de efectos para las variables sobre la señal a 5.2 ppm.

De esta forma se demuestra que el método no se ve afectado por las pequeñas variaciones probadas, validando que es robusto para el rango elegido.

3.7 Obtención del perfil metabolómico del modelo murino de EP

Se obtuvieron 28 muestras de heces del modelo murino con EP, que fueron resguardadas a -80°C . Trece muestras correspondían al grupo control y quince muestras al grupo expuesto a PQ, siendo este el grupo con EP inducida. Se obtuvieron los espectros (Fig. 20) conforme a las condiciones de la tabla 5 y procesados conforme a lo descrito en la sección 3.3.6.

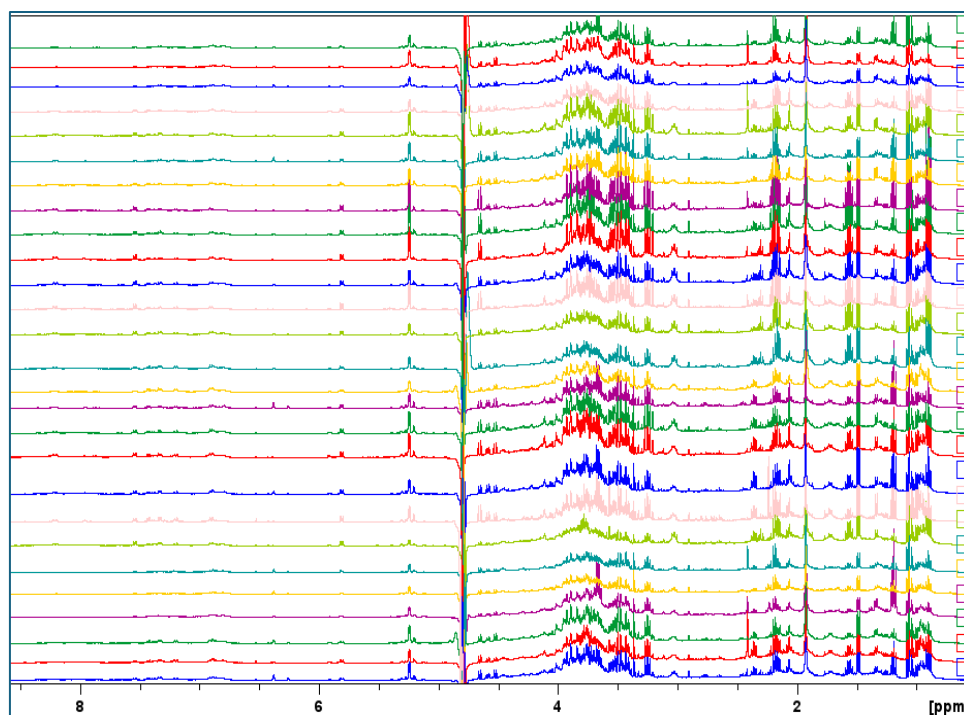


Figura 20. Espectros obtenidos de las muestras del modelo murino con enfermedad de Parkinson.

3.8 Procesamiento de los espectros

Una vez adquiridos, los espectros fueron procesados de la siguiente manera: a partir del FID se aplicó un valor de LB = 0.10 Hz; después se generó el espectro aplicando la transformada de Fourier y se ajustó la fase de forma manual; se utilizó el algoritmo ABSN para la corrección de la línea base y se ajustó el desplazamiento químico a cero con la señal de TSP del disolvente.

3.9 Análisis quimiométrico

3.9.1 Preprocesamiento espectral

- Selección de regiones relevantes

Una vez importados los datos espectrales en el software Matlab se seleccionaron las áreas que no aportan información importante para ser eliminadas. Dichas regiones fueron las áreas de los extremos del espectro (0.0 a 0.5 y 8.5 a 12.00 ppm), el área correspondiente a la supresión de la señal de agua (4.60 a 5.10 ppm), además del área definida como una de las señales del paraquat (4.55-4.58, 8.5 y 9.0 ppm) (Fig. 21).

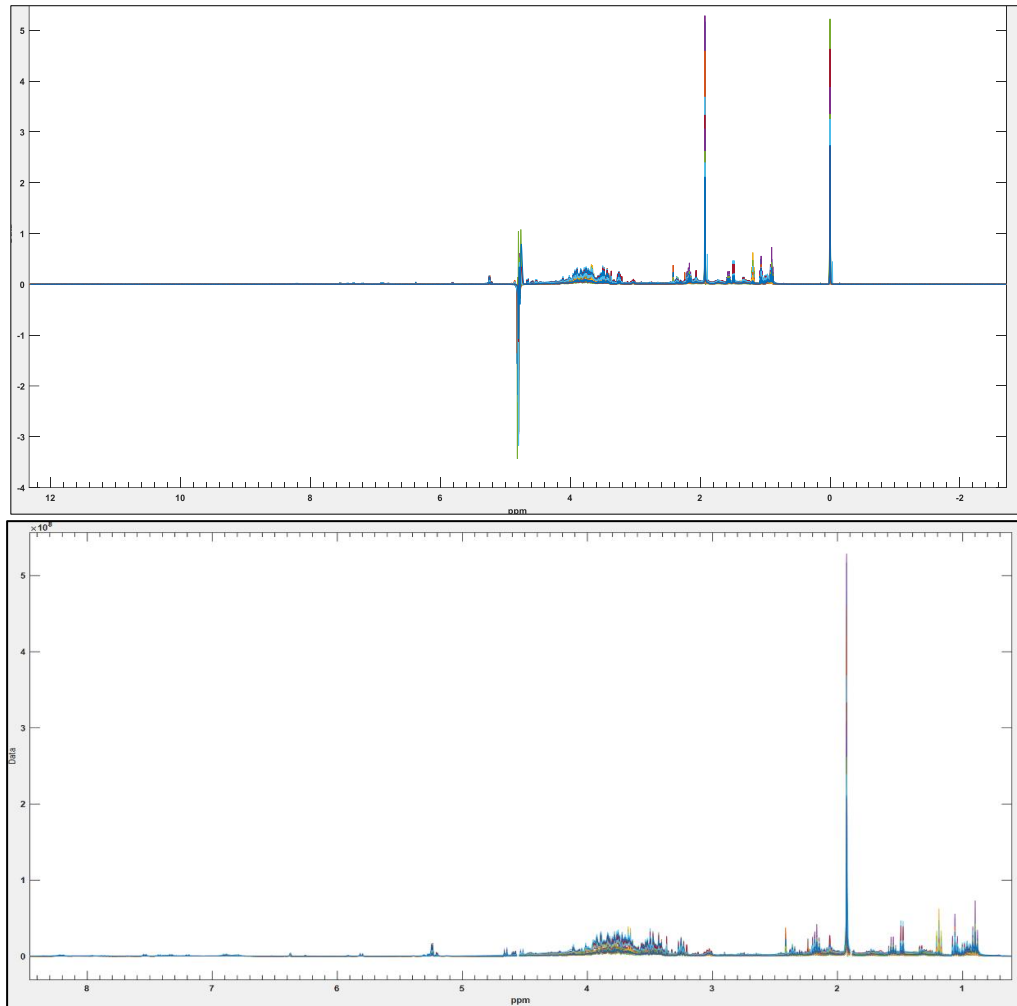


Figura 21. Espectros importados en programa Matlab antes y después de eliminar las regiones seleccionadas.

- Alineamiento de señales

El algoritmo utilizado para alinear las señales fue el iCoShift (Fig. 22), que calcula correlaciones cruzadas por intervalos (bloques) entre cada espectro y un espectro de referencia (F. Savorani, 2010).

Para un mejor resultado se seleccionaron grupos (1509 2611, 2821 3155, 3194 3942, 5194 5660, 5897 6400, 6600 6945, 6970 7135, 7140 7210, 7215 7530, 8266 8395, 10400 10500, 11720 12400, 17430 18250, 19650 20330, 22290 23000, 24240 24460, 24790 25020, 28300 28740, 28930 29660, 29840 30080), eligiendo las zonas por inspección visual a lo largo del espectro.

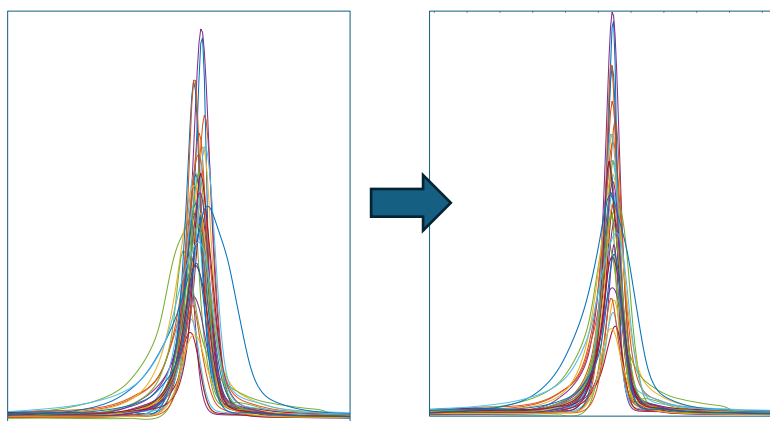


Figura 22. Señal a 1.9 ppm antes y después de aplicar el algoritmo iCoShift.

- Corrección de línea base

Se aplicó una corrección de línea base AWLS y se observó una mejor corrección al utilizar un orden polinomial de 3, como se observan los datos procesados en la figura 23.

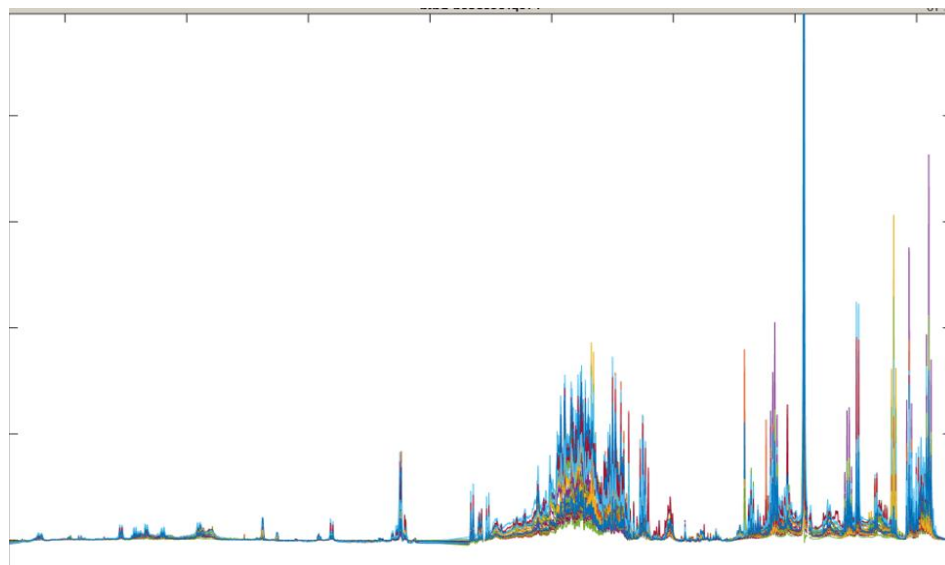


Figura 23. Espectros sobrepuestos con corrección de la línea base.

- Normalización

Para normalizar los datos se eligió la función PQN, la cual trata los datos mediante el coeficiente probabilístico, usando un espectro de referencia (la mediana de todos) (Fig.21).

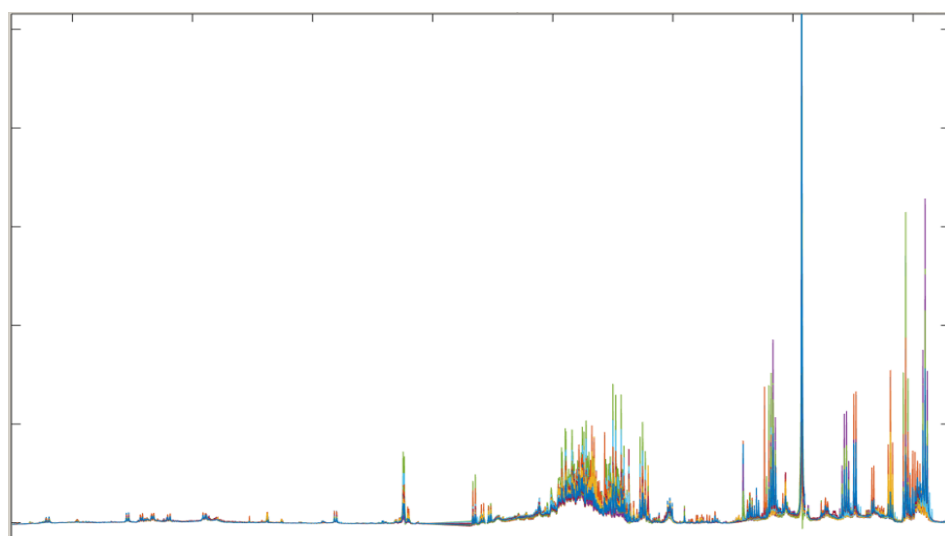


Figura 24. Espectros sobrepuestos aplicando corrección de la línea base y normalización.

- Centrado y escalado

El tratamiento final de la matriz es el centrado y escalado de los datos. Se hizo un centrado a la media en el cual se resta el espectro promedio generado a cada muestra (figura 25), y por último se realizó un escalamiento de Pareto que reduce la dominancia de las señales muy intensas sin amplificar en exceso el ruido de fondo.

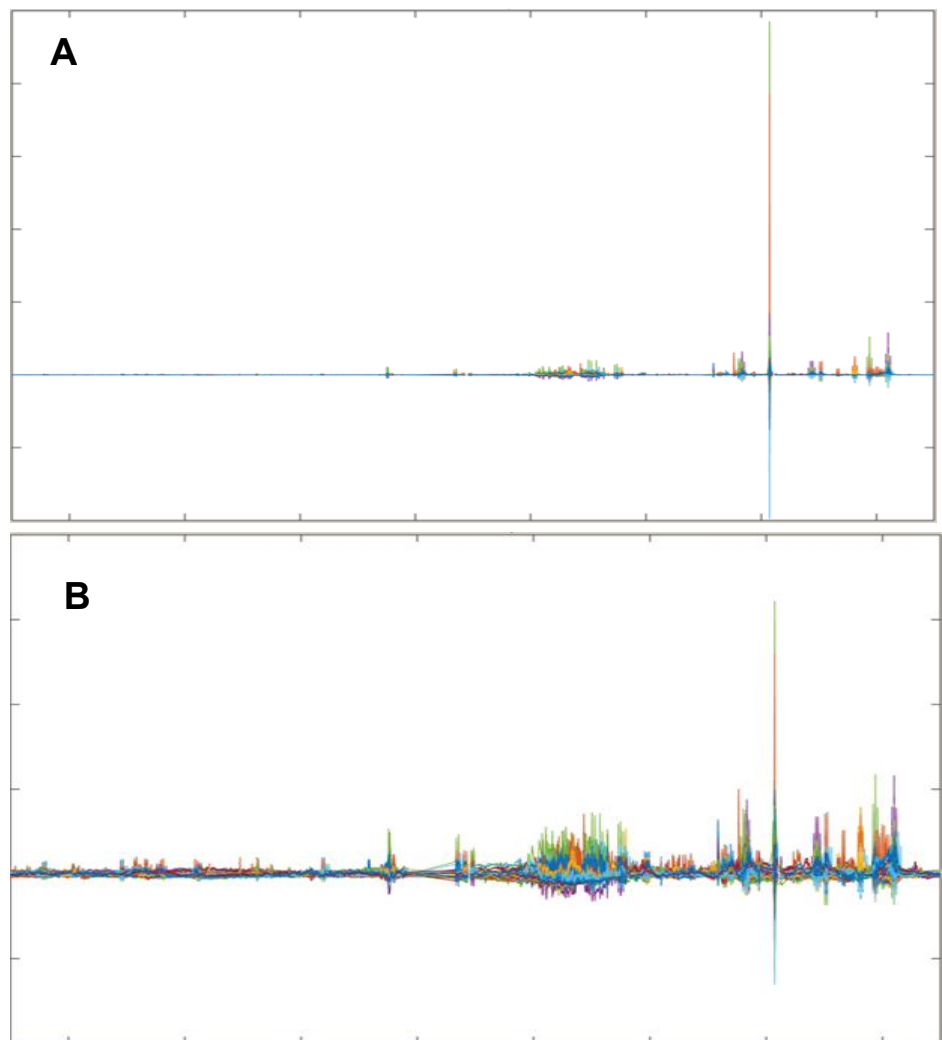


Figura 25. Espectros superpuestos con el tratamiento:

A. Centrado y B. Escalado aplicado.

3.9.2 Análisis de Componentes Principales

El modelo de PCA fue construido con el objetivo de explorar y comparar los pretratamientos de los datos e identificar la tendencia o agrupación de las muestras. En el primer modelo de PCA con el pretratamiento de PQN y centrado a la media se obtuvieron 5 PC, donde la PC1 explica el 83.72 % de la varianza, mientras que PC2 y PC3 explican solo 5.67% y 3.68 %. Se observan que los dos grupos de muestras presentan superposición entre sí (Fig. 26). Este modelo no permite evaluar de forma adecuada las diferencias entre los grupos. Por lo cual se buscó explorar otros pretratamientos de los datos.

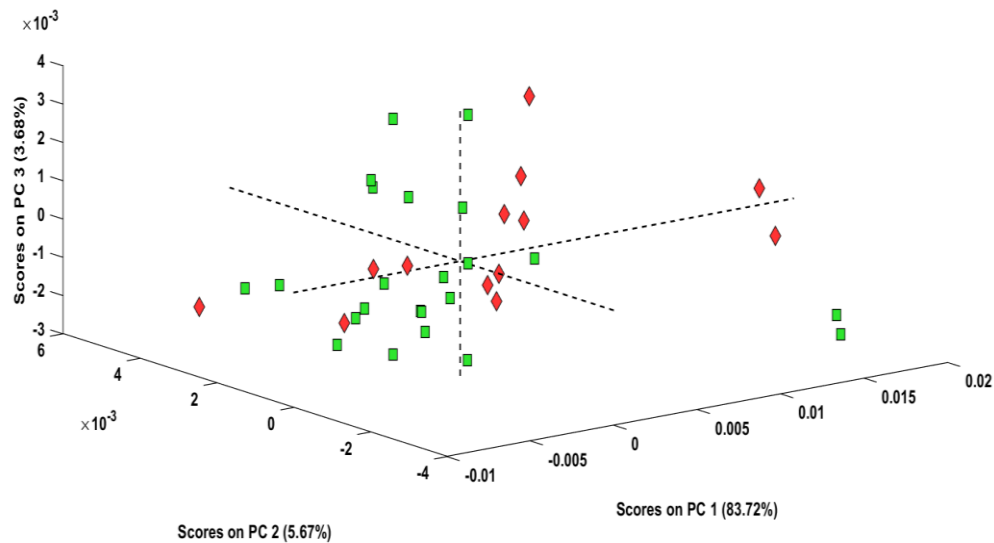


Figura 26. Gráfico de scores para los tres componentes principales con el tratamiento inicial (PQN y centrado a la media). Las muestras del grupo control  y muestras del modelo murino de EP 

En la figura 27 se muestra el modelo de PCA construido añadiendo la corrección de línea base y el escalado de Pareto a los pretratamientos de PQN y

centrado a la media. En el gráfico de scores con tres componentes principales, se distribuyó de la siguiente manera: 32.99%, 20.63% y 11.50% para PC1, PC2 y PC3 respectivamente. Este pretratamiento permito visualizar de mejor manera la distribución de las muestras y relacionarlo con la heterogeneidad química. En el gráfico B de la figura 27 se observa una tendencia general de las muestras identificadas como grupo control hacia valores positivos de la PC1, mientras que las muestras del grupo del modelo con EP se encuentran hacia valores negativos de la PC1. En el gráfico de T^2 frente a los residuos Q de la figura 28 no se observaron muestras definidas como “outliers”, si bien la muestra identificada como P404 y su réplica analítica P40B exceden el límite de confianza (95%) pero con residuales Q bajos, esto nos indica que si bien su variación espectral se logra describir con el modelo, las muestras están alejadas de su población y tienen una alta influencia sobre ésta, al estar muy próximas entre sí, se descarta un error aleatorio sugiriendo una respuesta atípica de las muestras provenientes del individuo. Su exclusión fue necesaria para evitar que el alto leverage individual dominara los PC y pudiera encubrir la varianza de la población.

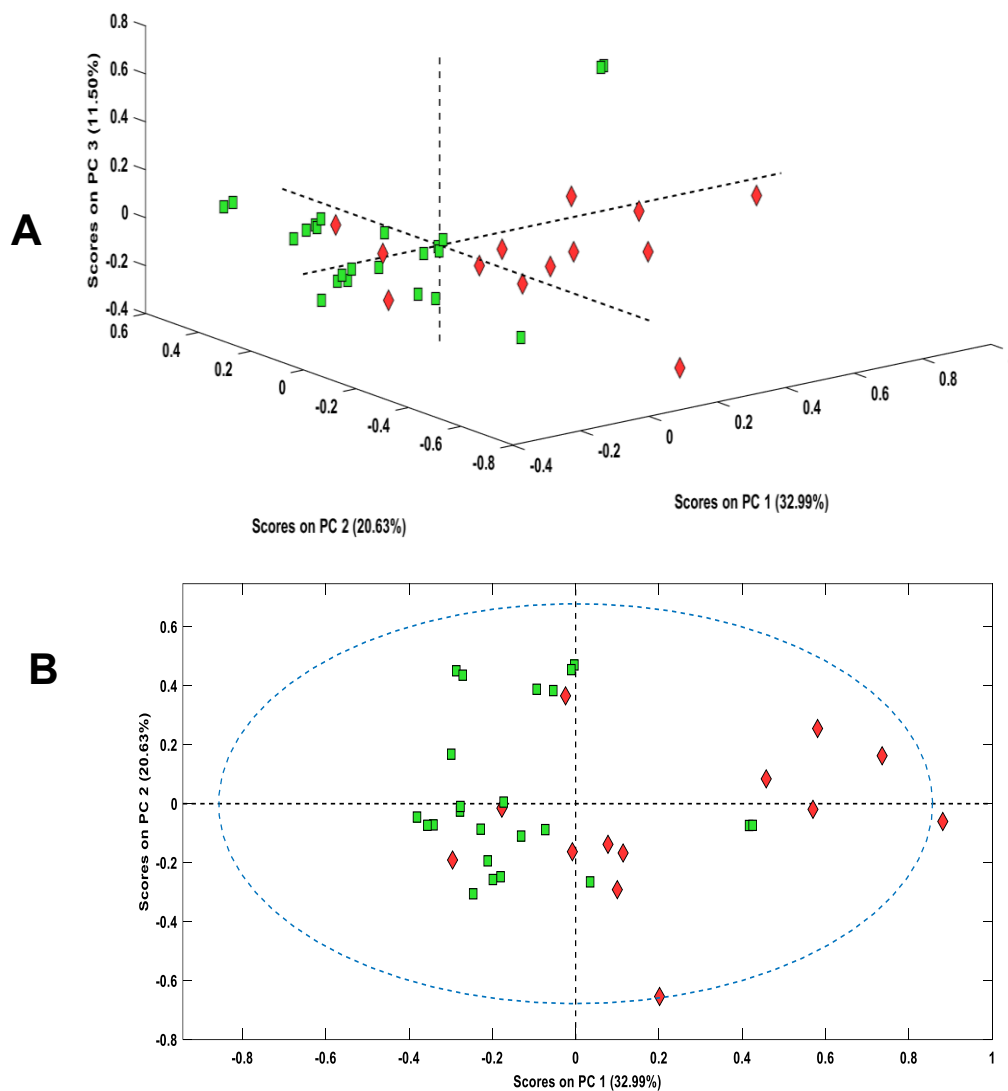


Figura 27. A. Gráfico de scores con tres componentes principales para el PCA con el tratamiento (Corrección de línea base, PQN, centrado a la media y escalado Pareto). B. Gráfico de scores del PC 1 frente al PC 2 con todas las muestras. Las muestras del grupo control ◆ y muestras del grupo modelo murino de EP ■

Durante la construcción y exploración de los modelos de PCA, al filtrar las muestras se observó un continuo cambio en los residuales Q. Muestras como la

P801/801B superaron los umbrales de varianza no explicada, al tener un residual Q elevado nos indicó que una proporción significativa de los datos de esa muestra no se ajusta a los componentes retenidos, lo cual suele asociarse a una gran variedad de artefactos posibles como desviaciones del procesamiento espectral, diferencias en la extracción de la muestra, variaciones de pH. Tras la eliminación de las muestras con alto leverage, muestras como la C801 evidenciaron también residuales elevados en el límite.

En el modelo de PCA con 29 muestras, excluidas dos muestras del grupo control (C605 y C606) y cinco muestras del grupo del modelo con EP (P404, P404B, P701, P801, P801B) cabe mencionar que dichas muestras no excedieron los límites estadísticos de T^2 o Q en el espacio no supervisado. Sin embargo, su exclusión fue debido al criterio integral del análisis quimiométrico y espectral de los perfiles obtenidos, ya que mostraron un patrón de señales que discrepaban de sus grupos. El modelo final capturó una varianza total de 68.58 % distribuida en PC1 que explica 37.43 %, PC2 el 21.46 % y PC3 el 9.69 % (figura 29). Se observa una mejor separación visual en la PC1 para la mayoría de las muestras control en valores positivos y las muestras del modelo con EP en valores negativos. La representación tridimensional de las componentes principales confirma que existe una tendencia en la separación de los grupos y que se requiere de la PC3 para explicar los perfiles. En la tabla 10 se observa el resumen de los modelos de PCA creados con los resultados obtenidos.

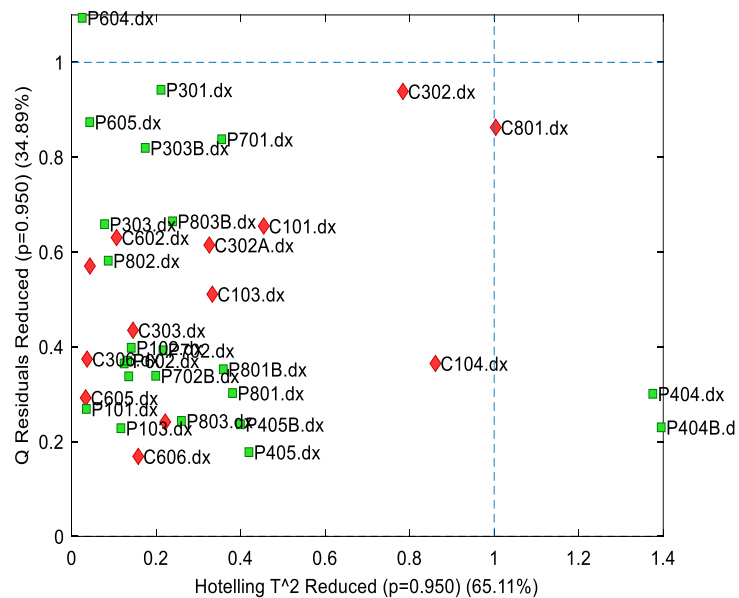


Figura 28. Gráfico de T^2 frente a residuos Q.

Tabla 10.Comparación de los modelos no supervisados

Modelo	Muestras	Pretratamiento	Componentes	Distribución de la varianza
PCA inicial	36	Normalizado PQ y centrado a la media	5 PC	PC1:83.7 % PC2: 5.67% PC3: 3.68% Total de 5PC= 96.35%
PCA	36	Corrección de línea base, PQN, Centrado a la media y Escalado de Pareto	3 PC	PC1:32.99% PC2:20.63% PC3: 11.50%
PCA reducido	29	Corrección de línea base, PQN, Centrado a la media y Escalado de Pareto	3 PC	PC1:37.43% PC2:21.46% PC3:9.69 % Total de 68.58 %

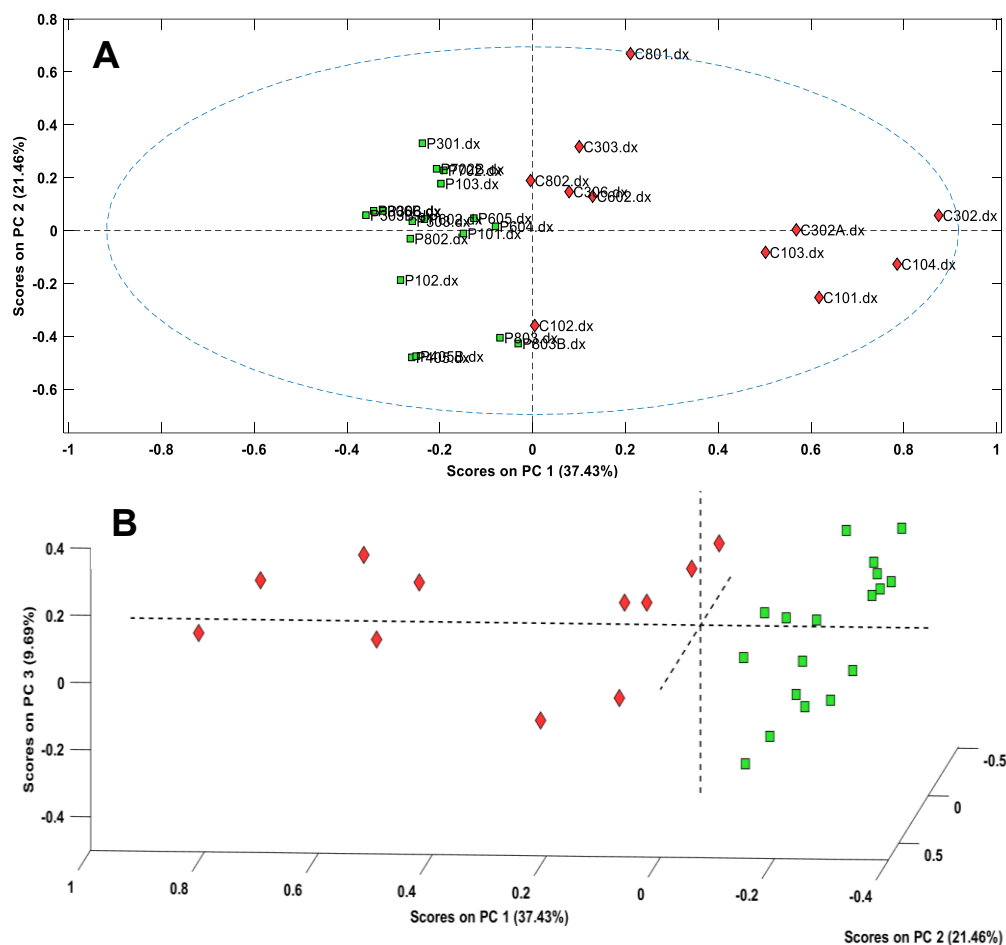


Figura 29. A) Corresponde al gráfico de Scores para dos CP después de excluir muestras y B) Gráfica con 3 CP.

Los gráficos de loadings para cada CP se muestran en la figura 30. Al analizarlos para cada PC, en la PC1 se observan que las variables que aportan la diferencia corresponden a señales espectrales de ^1H a 0.9-1.5, 1.9, 2.1-2.4, 3.2 a 4.0 y 5.2 ppm que corresponde a regiones espectrales llamadas “zona de alifáticos y de carbohidratos”. En el grafico B de loadings para la PC2 se presentan variables con contribuciones positivas y negativas en regiones saturadas de señales, sobresale una señal positiva a 1.9, 1 y 1.5 ppm favorecen a las muestras

con valores positivos de la PC2 y las regiones negativas entre 3.2 a 4.1 ppm en PC2. La variable que vuelve a sobresalir en la PC3 es la señal a 1.9 ppm. Posteriormente se relacionaron las señales en el espectro de RMN para identificar posibles metabolitos que coincidieran con el desplazamiento químico que definieran la separación entre los grupos, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Posibles metabolitos diferenciadores

Región espectral aproximada (ppm)	Asignación posible metabolito	Contribución
0.88-0.92, 1.54-1.58 y 2.16-2.24	Butirato	Mayor en grupo control
1.04-1.08 y 2.3-2.4	Propionato	Mayor en grupo control
1.4 -1.5	Alanina	Mayor en grupo control
1.9-1.93	Acetato	Mayor en grupo control
3.2 - 4.0	Glucosa y otros carbohidratos. Taurina Glicina Betaína Colina	Mayor en grupo control
5.2	Glucosa	Mayor en grupo control
6.8-8.3	Tirosina, fenilalanina, hipurato	Menor contribución, variable en los grupos

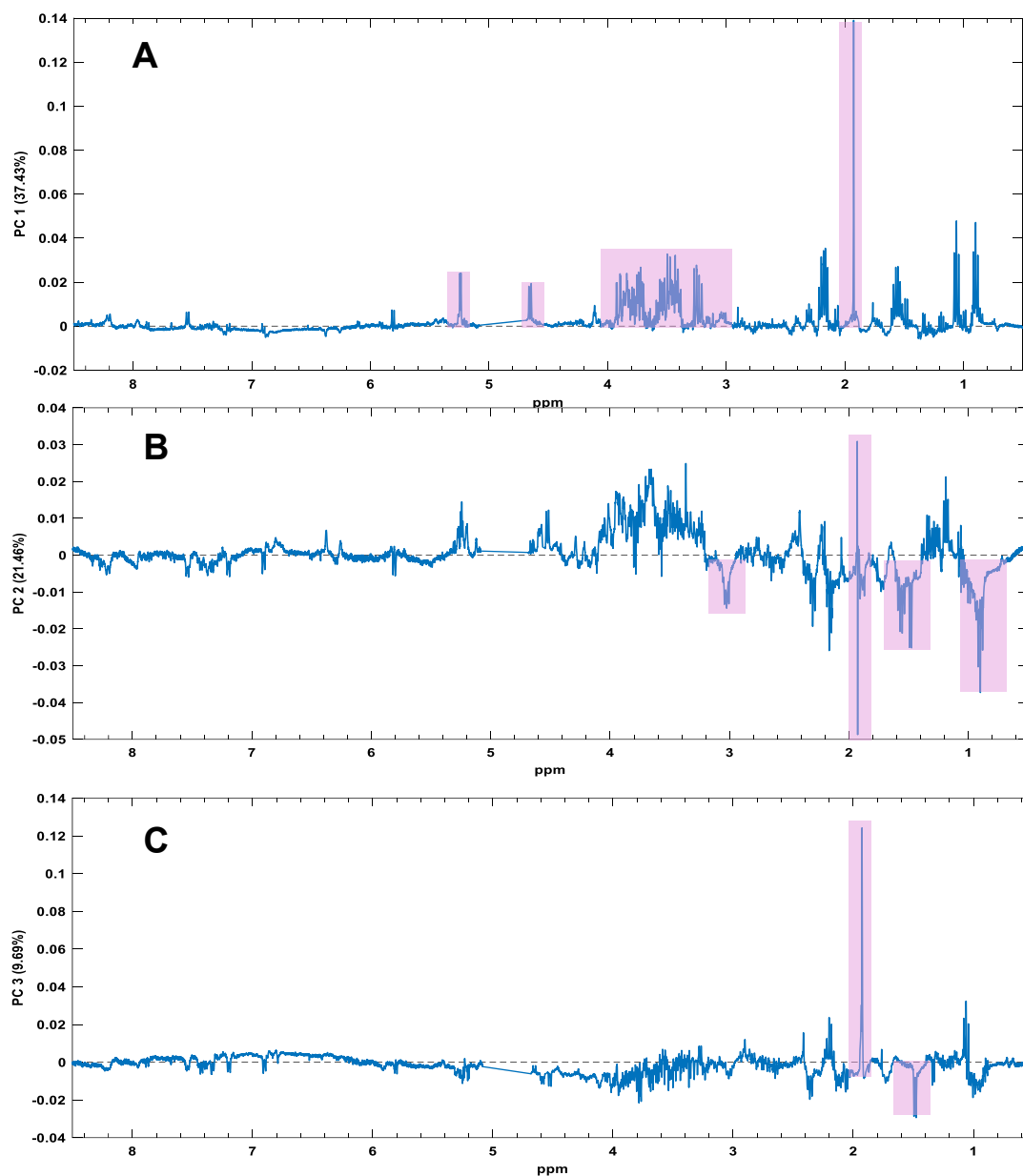


Figura 30. Gráfico de loadings del modelo de PCA final con 29 muestras.

A) Gráfico de loadings de la PC1. B) Gráfico de loadings de la PC2. C) Gráfico de loadings de la PC3. Las regiones señaladas en rosa corresponden a regiones espectrales de AGCC (1.0, 1.9 ppm) y carbohidratos (3.20-4.00 y 5.2 ppm), algunos metabolitos aromáticos (6.4 – 8.3 ppm).

3.9.3 Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales

Durante la evaluación del modelo PLS-DA exploratorio que se realizó añadiendo la matriz de datos con todas las muestras adquiridas. En la figura 31 se muestra el gráfico A, donde se presenta el estadístico T2 frente a los residuales Q y podemos identificar a una muestra de la clase del modelo murino de EP que presenta un alta influencia respecto a la media de las demás muestras, y una muestra del grupo control con valor de residuo alto, señaladas en el gráfico. En el gráfico indicado con la letra B de la figura 31 se observa la respuesta Y1 predicha para la pertenencia del grupo control con un valor de corte 0.4, scores por encima de este valor se clasifican como grupo control y scores por debajo como del grupo modelo de EP. Se pueden observar que tres muestras (identificadas como C102, C605 y C606) están por debajo del valor de corte, aunque son muestras del grupo control, mientras que una muestra (P701) está por encima del valor de corte a pesar de ser del grupo del modelo murino de EP.

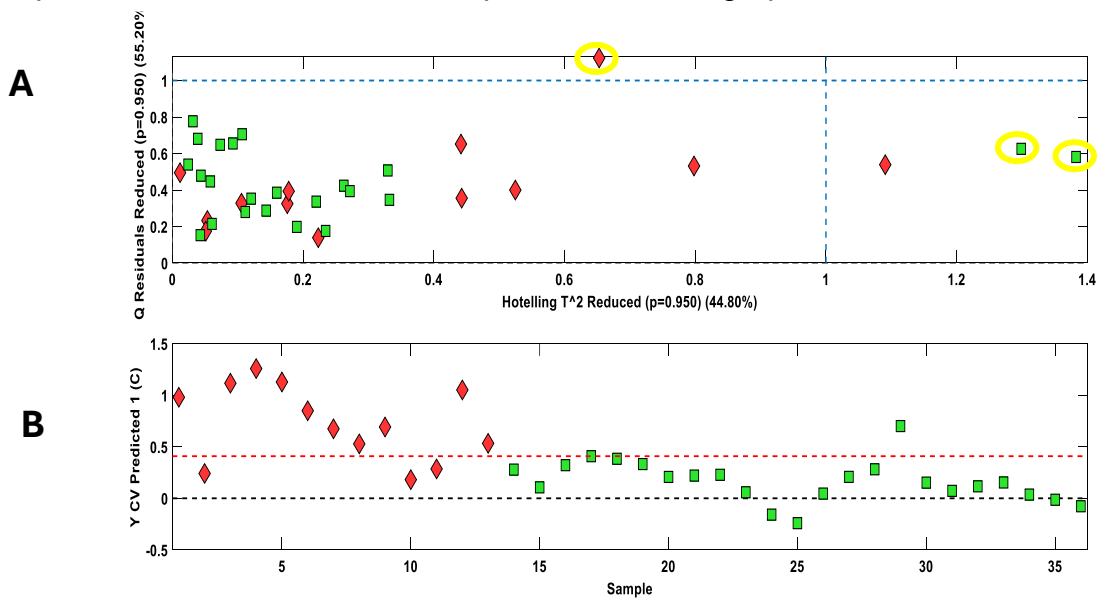


Figura 31. A. Gráfico de T^2 frente a Q residual del modelo PLS-DA, B. Gráfico de la respuesta predicha para la clase control con punto de corte 0.4

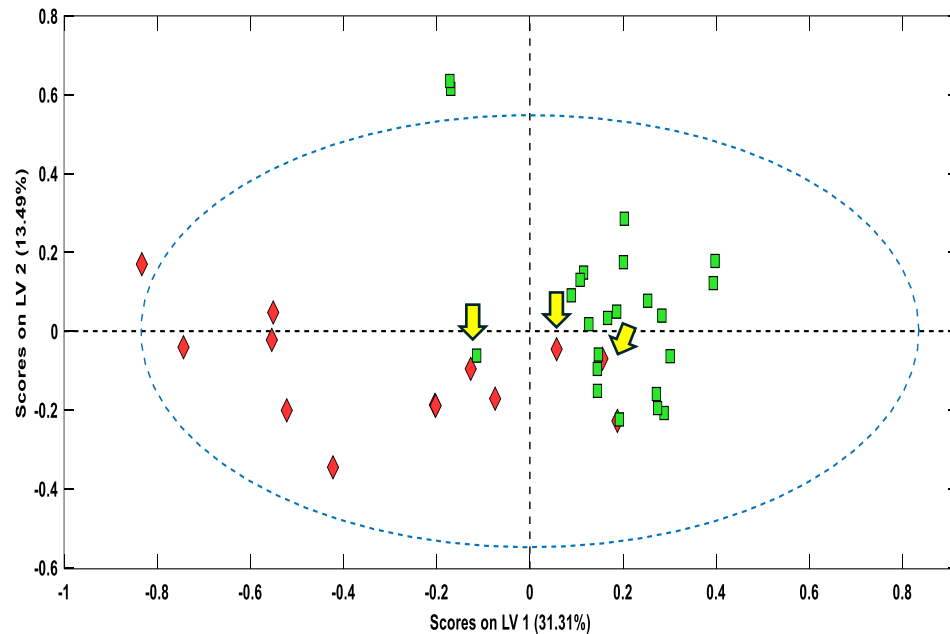


Figura 32. Gráfico de scores de la LV1 frente a la LV2 del modelo construido con todas las muestras. Señaladas en amarillo las muestras mal clasificadas.

El gráfico de scores creado del modelo con dos variables latentes se observa que la clase control se presenta en valores negativos de la LV1 y las muestras de la clase del modelo murino de EP en valores positivos de LV1. Además, se confirma la identificación de cuatro muestras identificadas en el gráfico de la respuesta predicha para el grupo control, que se encuentran clasificadas o posicionadas de forma confusa con su clase. Se realizó la validación cruzada de la respuesta Y1 predicha frente a la clase medida Y1 del grupo control. Obteniendo valores de sensibilidad y especificidad de la validación

cruzada de 0.769 y 0.913, con R^2 igual a 0.516 (Fig. 33, letra A). Las muestras identificadas como C102, C605 y C606 mostraron una proyección afín al grupo tratado con paraquat del modelo murino de EP, mientras que la muestra P701 mostró un perfil similar al grupo control. Para justificar su exclusión en el modelo final, estas observaciones fueron sometidas a un análisis de diagnóstico de valores atípicos. Las muestras presentaron anomalías en sus residuales y una de ellas con una alta influencia, lo que incrementaba significativamente el error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV) del modelo global. Por lo tanto, su exclusión fue necesaria para mejorar la robustez predictiva y evitar el sobreajuste en la extracción de los biomarcadores VIP. El siguiente modelo de PLS-DA se construyó excluyendo las muestras atípicas (C102, C605, C606 y P701). En donde el gráfico de scores para las dos variables latentes el LV1 explica el 32.46% y LV2 el 14.66% de la varianza. Se observa una mejor separación entre clases y se confirma que la clase del grupo control se ubica en el lado negativo de la LV1, mientras que la clase del modelo murino de EP se ubica a valores positivos de LV1.

La validación cruzada presentó una mejoría en los valores de sensibilidad, especificidad y R^2 del modelo (Fig. 33, inciso B). Las muestras del grupo control se ubican por encima del valor de corte de 0.4 y las muestras del grupo del modelo de EP por debajo de 0.4.

La interpretación del gráfico de loadings para la LV1 tiene mayormente variables negativas en las regiones alrededor de 0.9-1.1, 1.4-1.7, 1.9, 2.1-2.4, 3.2-4.0 y 5.2 ppm. Al tener el grupo control scores negativos de LV1 estas señales se

asocian con tener una mayor intensidad en el grupo control. Los loadings de LV2 presentan una variable positiva predominante alrededor de 1.9 ppm (Fig. 35).

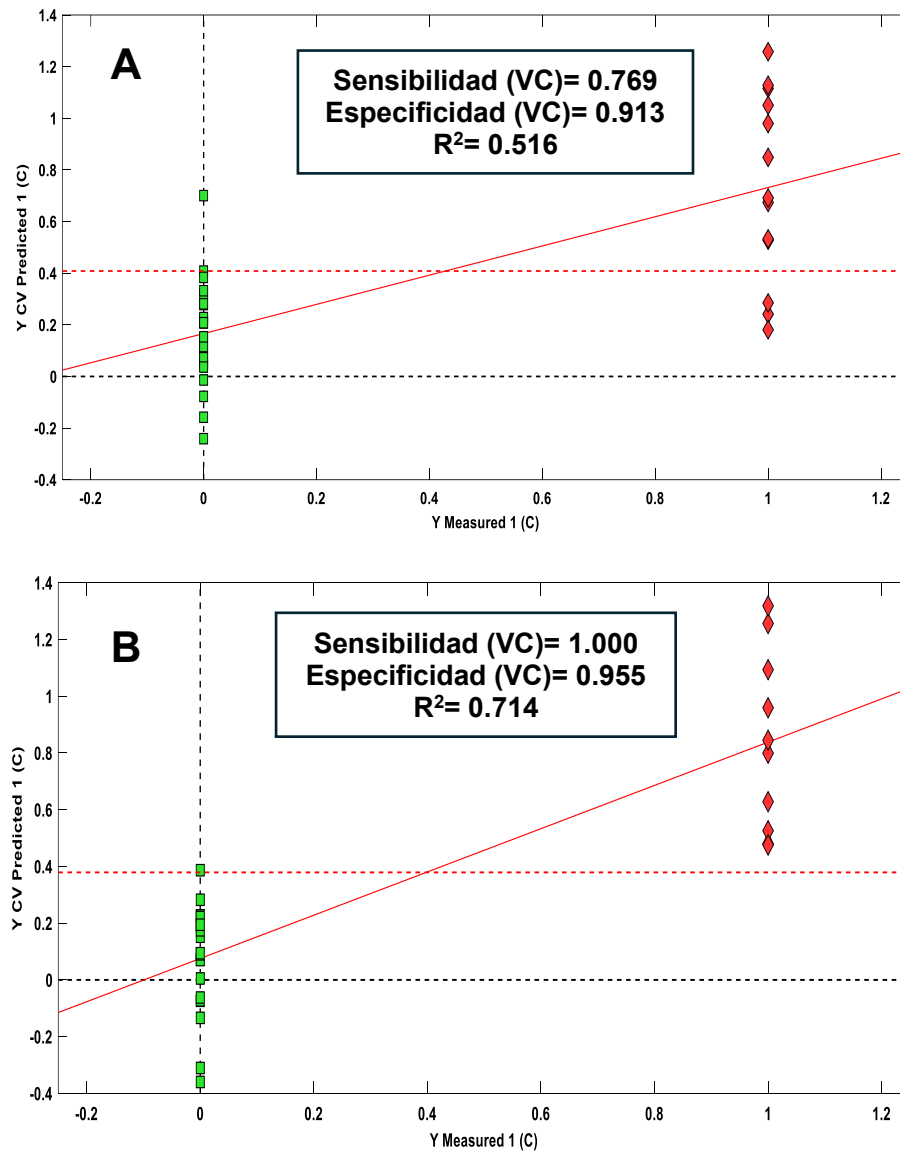


Figura 33. A. Gráfico de la validación cruzada de la respuesta predicha del grupo control frente a la respuesta medida del grupo control con todas las muestras, B. Una vez excluidas las muestras atípicas.

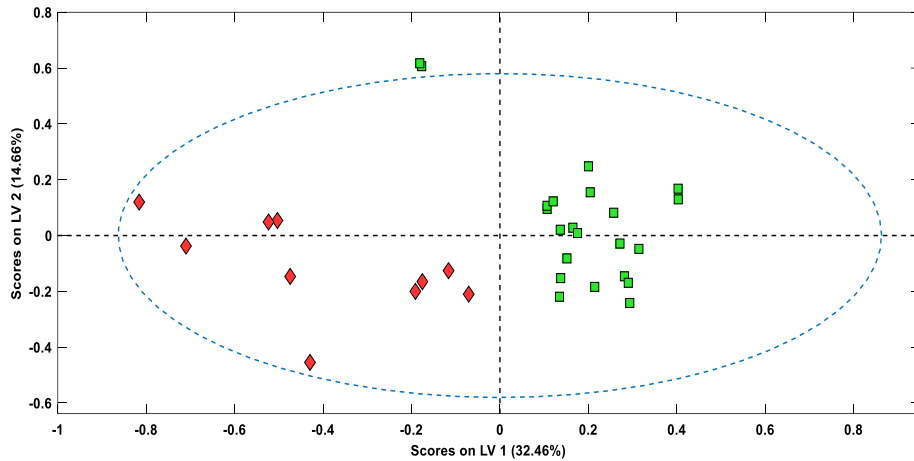


Figura 34. Gráfico de scores de la LV1 frente a la LV2 del modelo construido sin las muestras atípicas.

Se generó el gráfico de la Importancia de la Variable en la Proyección (VIP) que permite medir la influencia y contribución de cada variable en la separación de los grupos. En la figura 36 se muestra el VIP para la clase control con un valor de corte de 1.0, donde sobresale la variable a 1.9 ppm que tiene un valor alrededor de 19. Además de algunas variables con VIP mayor a 1 en regiones alrededor de 0.9-1.1, 1.4-1.7, 2.1-2.4, 3.2-4.0 y 5.2 ppm.

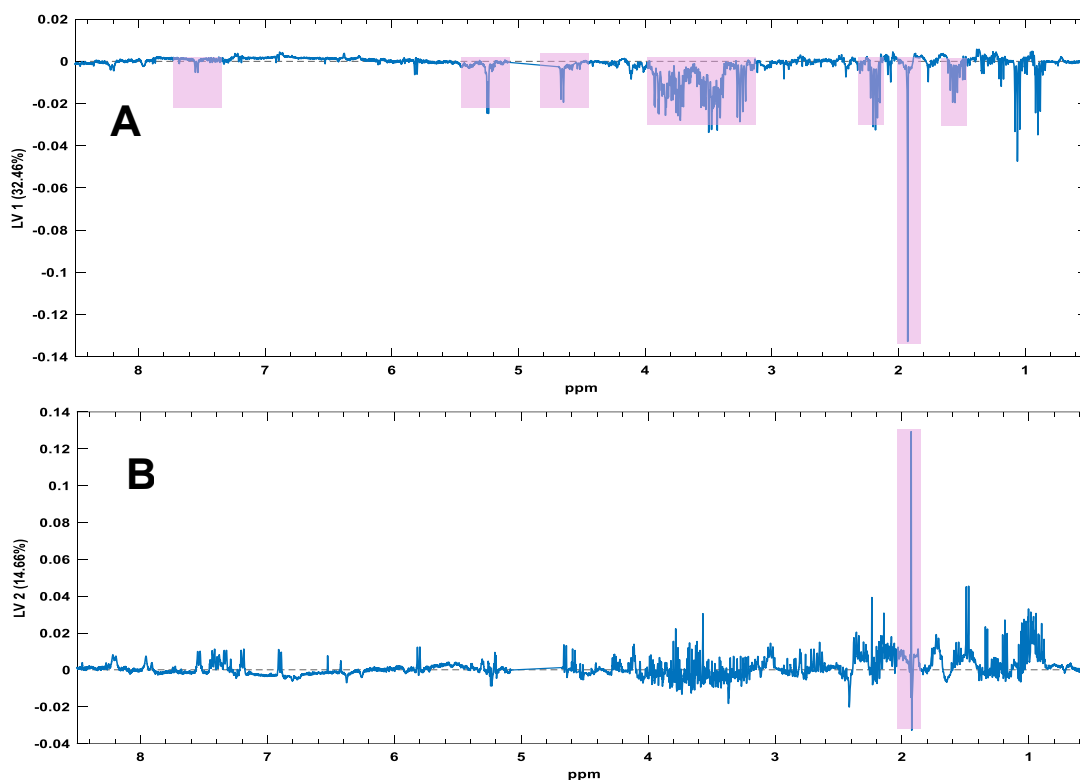


Figura 35. Gráfico de loadings del modelo PLS-DA. A. Para la LV1. Para la LV2.

Las regiones señaladas en rosa corresponden a regiones espectrales de AGCC (1.0, 1.9 ppm) y carbohidratos (3.20-4.00 y 5.2 ppm), algunos metabolitos aromáticos (6.4 – 8.3 ppm).

El análisis de las curvas ROC (Fig. 37) mostró un área bajo la curva (AUC) de 1.000, lo que refleja una clasificación perfecta tanto en la estimación como en la validación cruzada tras la exclusión de algunas muestras atípicas. Sin embargo, dado que el modelo final se construyó con un tamaño de muestra reducido, estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que un valor perfecto de predicción podría representar un escenario excesivamente optimista. Con valores de 0.955 para la especificidad del grupo control y sensibilidad del 0.955 para el grupo modelo de EP.

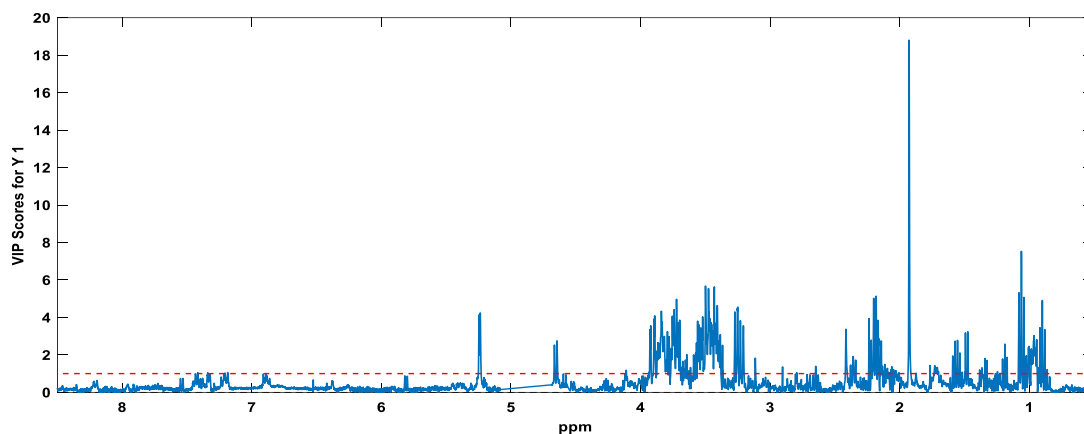


Figura 36. Gráfico de la Importancia de la variable en la proyección para el grupo control.

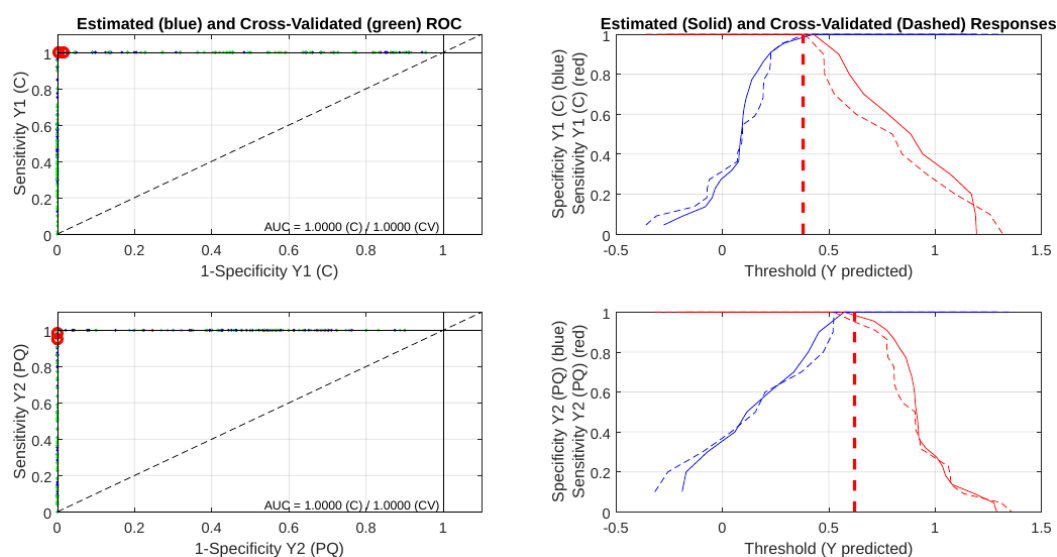


Figura 37. Curvas ROC y relación sensibilidad – especificidad frente al umbral para el grupo control (Y1) y el grupo del modelo de EP (Y2).

En la figura 39 se presenta la probabilidad entre 0 y 1 de pertenecer a la clase del grupo control (valor de 1). Se observa que algunas muestras del grupo control tienen una probabilidad ligeramente inferior a 1 sin acercarse al valor de corte 0.4, por lo que se clasifican de forma correcta en su clase. Mientras que algunas muestras del grupo de modelo con EP presentan una probabilidad mayor

de cero lo que indicaría un cierto parecido espectral con las muestras de la clase del grupo control, siendo su valor de probabilidad menor al valor de corte.

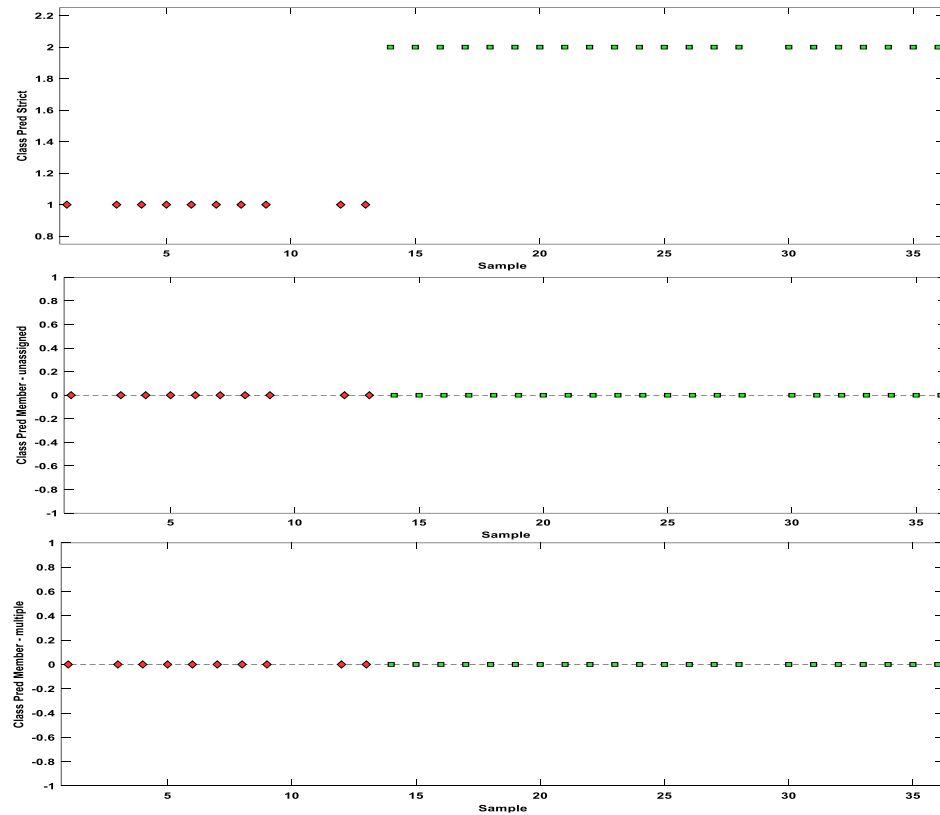


Figura 38. Muestras en función de la A) clase estrictamente predicha, B) clase predicha no asignada, C) clase predicha múltiple.

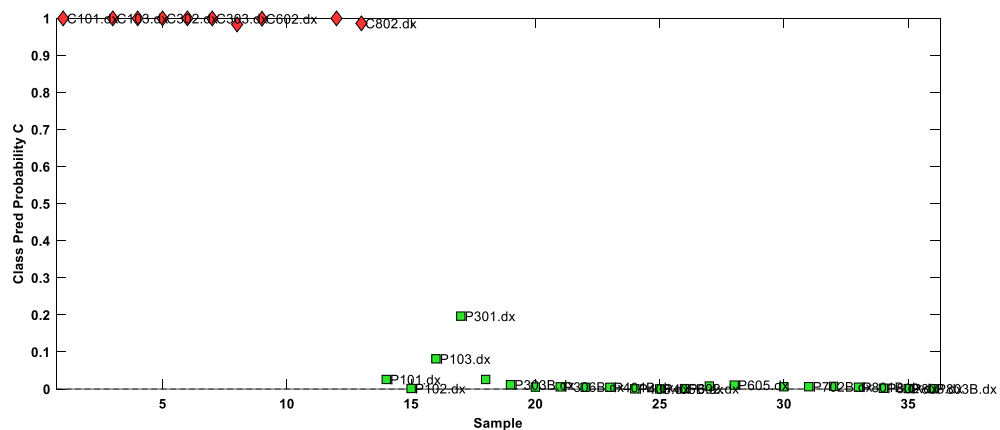


Figura 39. Muestras en función de la respuesta predicha para la clase del grupo control.

CAPÍTULO 4

4 DISCUSIÓN

La EP es un trastorno neurodegenerativo con un alto índice de prevalencia a nivel mundial, existen diversas teorías sobre el origen de la enfermedad siendo una de ellas la propuesta por Braak llamada teoría anatómica ascendente, que involucra al sistema nervioso entérico (Braak, y otros, 2003) por lo que una muestra representativa para estudiar este eje son las muestras de heces, sin embargo al ser una muestra heterogénea con alta carga bacteriana representa un reto para su tratamiento.

Se discutirá en el siguiente trabajo las condiciones para establecer el perfil metabolómico por ^1H -RMN del modelo murino de EP inducido por PQ. Se estableció el tratamiento de las muestras con ensayos para determinar el efecto de la dilución y el tipo de disolvente de extracción, una vez obtenido las condiciones de extracción, es importante determinar los parámetros de adquisición y procesamiento espectral adecuados para el tipo de muestra, además como parte de la evaluación del método analítico se determinó la precisión en términos de reproducibilidad y precisión intermedia, la estabilidad del proceso de extracción en muestras reales adicionadas con estándar de fenilalanina y la robustez del método. Así como los resultados obtenidos en la

parte del análisis quimiométrico se realizó un estudio no supervisado con el PCA, con la finalidad de establecer el preprocesamiento adecuado de los datos y observar la distribución de las muestras. Posteriormente se realizó el análisis supervisado con el PLS-DA para confirmar la separación entre los grupos de estudio y se determinó las variables que aportan mayor importancia para la diferenciación del perfil con los posibles metabolitos identificados.

Para comenzar, se evaluó el efecto de la dilución de la muestra, variando la cantidad inicial de peso frente a un volumen constante de disolvente. La cantidad de muestra es un factor crítico en RMN; una concentración demasiado baja compromete la detección de metabolitos poco abundantes, mientras que una concentración excesiva incrementa la viscosidad y la presencia de macromoléculas, lo cual puede interferir con la homogeneidad del campo magnético y en algunos casos con la correcta supresión de la señal del disolvente al utilizar una secuencia de pulsos con gradiente para obtener los espectros de ^1H -RMN.

Con el fin de determinar la proporción adecuada para la obtención del perfil metabolómico en heces de ratón, se prepararon extractos evaluando tres cantidades distintas de heces de ratón: 50 mg, 100 mg y 150 mg. Todas las muestras fueron procesadas de manera estandarizada en un volumen final de 700 μL de PBS 10 mM a pH=7.4, con un 10% de D_2O (0.75% TSP) para el bloqueo de la frecuencia en RMN y la calibración del espectro. Los espectros de ^1H -RMN fueron adquiridos utilizando exactamente los mismos parámetros instrumentales. Al comparar los perfiles, se observó que el espectro obtenido con 50 mg de muestra mostró una concentración disminuida de metabolitos. Esta alta

dilución generó una menor relación señal/ruido, por lo que no se considera adecuada para la detección de los analitos minoritarios, limitando así el alcance del perfil metabólico. Por otra parte, si bien los espectros obtenidos con 150 mg de muestra aportan una mayor intensidad de las señales debido a la alta cantidad de restos de materia orgánica presentes, se dificultó la obtención de un campo magnético homogéneo, lo que se representa en un ensanchamiento de las señales y distorsiones en la línea base. Además, un exceso de materia puede interferir con la eficiencia de la secuencia de pulsos para la supresión de la señal del agua. La cantidad de 100 mg (1:7 p/v con PBS) resultó el balance ideal entre concentración y calidad espectral. Esta dilución proporcionó una buena relación S/R, permitiendo la visualización de un amplio rango de señales, una disolución sin partículas suspendidas que facilitó la homogeneidad del campo magnético, garantizando señales definidas, resueltas y una línea base plana.

A la par se evaluó el número de scans, dado que este valor determina la cantidad de veces que se repite la adquisición del experimento, representa la forma más directa para incrementar la sensibilidad y mejorar la relación S/R, lo cual es un factor muy importante al trabajar con muestras biológicas complejas y diluidas. Con el objetivo de encontrar una adecuada detección de analitos y una buena resolución espectral, se probaron tres valores distintos de NS 128, 256 y 512. Al analizar de forma comparativa los espectros obtenidos, se observó lo siguiente, con 128 scans se presentó una baja relación S/R, lo que limitó la sensibilidad para la visualización de metabolitos en bajas concentraciones. Si bien al adquirir los espectros con 512 scans se aumentó la sensibilidad del espectro, se mostró que un exceso en el número de repeticiones provocó un

crecimiento desproporcionado en las señales más intensas del espectro hasta tal punto de enmascarar y solapar las señales contiguas de menor intensidad, comprometiendo así la resolución. Este valor incrementó significativamente la sensibilidad y la relación S/R respecto al NS de 128, permitiendo una clara identificación de las señales de interés, pero sin llegar a saturar o ensanchar las señales mayoritarias como ocurrió con el NS de 512.

El tipo de disolvente en los procesos de extracción determina la selectividad y eficiencia con las que se extraen diferentes clases de metabolitos. Por ejemplo, si utilizamos un solvente altamente polar, como son las soluciones acuosas extraeremos los analitos semejantes, como algunos aminoácidos, azúcares simples, aminas, bases nitrogenadas y algunos ácidos orgánicos. El metanol es un disolvente polar que es miscible con el agua y con otros disolventes no polares, como el cloroformo. Este tipo de disolvente por sus propiedades fisicoquímicas nos permite extraer una gran variedad de metabolitos de polaridad intermedia. Tomando en cuenta esto se eligieron tres tipos de disolventes para la selección del que nos permitiera tener un perfil metabolómico en heces de ratón que abarcara un amplio rango de metabolitos cumpliendo con las condiciones analíticas requeridas. Se obtuvo el espectro del extracto fecal en PBS 1x pH 7.4 (10% D₂O con 0.75%TSP), con metanol deuterado y con una mezcla de dichos disolventes en proporción 1:1, los cuales se muestran en las figuras 7 y 8.

De forma general, los espectros mostraron un patrón característico de la matriz fecal. Sin embargo, en los extractos de CD₃OD se evidenció un corrimiento en el desplazamiento químico de múltiples señales que es propio del ambiente

químico generado por el disolvente, siendo la zona de los compuestos aromáticos la que presentó mayor variación.

En los espectros obtenidos del extracto fecal metanólico, si bien hay una mayor intensidad de los analitos en la región de campo bajo del espectro, se observó una ligera deformación en la señal predominante del metanol, la cual debe resolverse como un multiplete a 3.31 ppm. Sin embargo, no mantuvo una forma constante, lo cual podría ser atribuido a una falta de homogeneidad del campo magnético por alguna variabilidad inherente a la muestra, como el intercambio isotópico dinámico de protón-deuterio con la humedad residual de las heces. Las interacciones de solvatación del metanol con las distintas fracciones lipídicas de la muestra alteran de forma inconsistente la susceptibilidad magnética local, distorsionando la estructura de los multipletes (Claridge, 2016).

En el espectro obtenido de la mezcla de PBS:CD₃OD, se presentó la aparición de ciertos artefactos de las señales, caracterizados por un decaimiento o hundimiento en la línea base alrededor de los picos principales. El uso de mezclas hidroalcohólicas complejas altera severamente el entorno dieléctrico de la muestra. Al aplicar secuencias de pulsos con presaturación para suprimir la señal del disolvente, la presencia de múltiples frentes de solvatación y diferentes tiempos de relajación en la mezcla provoca distorsiones de fase de primer orden. Estos hundimientos impiden una corrección precisa de fase algorítmica e introducen errores insalvables al momento de integrar el área bajo la curva de los metabolitos adyacentes (Mckay, 2011; Beckonert, 2007). Siendo estos espectros no aptos para utilizar en un análisis quimiométrico por su baja calidad espectral.

En el espectro obtenido a partir del extracto acuoso con PBS se observa una línea base plana sin artefactos de la adquisición espectral. La estabilización del ambiente químico al controlar el pH mostró una buena reproducibilidad y facilitó la extracción de metabolitos clave como aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos productos de la microbiota intestinal. Por lo cual se optó por obtener los extractos de heces con PBS ya que mantiene condiciones estables y puede mejorar la extracción de ciertos metabolitos, además de facilitar la comparación entre estudios debido a su estabilidad en el patrón de señales obtenido.

En los experimentos que emplean secuencias de pulsos tipo 1D-NOESY con presaturación, el tiempo de mezclado es una variable crítica para la calidad del espectro. Durante este periodo, la magnetización de interés se alinea longitudinalmente con el eje z, permitiendo la aplicación de pulsos de gradiente de campo magnético. La función principal de estos gradientes es destruir cualquier magnetización transversal residual. Este proceso es esencial para eliminar artefactos en la fase, optimizar la supresión de la señal del agua y minimizar las señales anchas provenientes de macromoléculas (como proteínas o fracciones lipídicas no precipitadas), las cuales son responsables de generar distorsiones severas en la línea base (Mckay, 2011).

Para el análisis de matrices biológicas complejas, la literatura sugiere un rango de entre 0.01 y 0.10 segundos para D8. Para determinar el valor apropiado en las muestras de extractos de heces de ratón se obtuvieron espectros con $D8=0.01$, 0.05 y 0.10 segundos. Se estableció un valor de $D8 = 0.05$ segundos como el valor óptimo. Este tiempo es lo suficientemente largo para garantizar que los pulsos de gradiente limpien por completo la magnetización transversal

residual obteniendo una la línea base sin distorsión, pero lo suficientemente corto para inhibir la transferencia de magnetización por difusión de espín NOE, asegurando así que las intensidades de las señales se mantengan constantes y corresponda a la concentración de los analitos y no a un efecto NOE.

El D1 es el tiempo de espera entre un pulso de radiofrecuencia y el siguiente. Su propósito es permitir que los núcleos regresen a su estado de equilibrio térmico a través de la relajación. Si el D1 es demasiado corto, los núcleos no se relajan por completo y por lo tanto no emiten de forma completa la señal de radiofrecuencia. Una regla es que la suma del tiempo de adquisición y el D1 alcance al menos 5 veces el T_1 de los analitos de interés, asegurando así una recuperación superior al 99% de la magnetización. Si se aplica un nuevo pulso antes de lograr esta recuperación total, ocurre un fenómeno de saturación parcial, donde las señales pierden intensidad progresivamente en cada escaneo, alterando las áreas de integración (Claridge, 2016).

Una forma práctica de evaluar o determinar el valor del tiempo de relajación es obteniendo los espectros a diferentes tiempo de D1 y comparando la intensidad de las señales. Se espera que al aumentar el tiempo de D1 aumente la intensidad de la señal. Dicho esto, al tener un tiempo muy largo de D1, el tiempo de análisis para la adquisición del espectro aumentaría. Para ensayos de cuantificación se recomiendan tiempos de D1 entre 5 a 15 segundos, mientras que, para la determinación de perfil metabolómico, los tiempos de D1 varían entre 1 a 5 segundos, que es suficiente para asegurar una relajación completa de los núcleos. En la figura 11 se aprecia un aumento entre la intensidad de la señal del espectro obtenido con D1 de 2 s y el espectro obtenido con un D1 de 5 segundos,

y confirma que un tiempo de 2 segundos no es suficiente para los metabolitos con tiempos de relajación más prolongados que sufrieron saturación parcial. Mientras que el espectro obtenido con un tiempo de 4 segundos es muy similar al obtenido con 5 s, esto quiere decir que ambos están cerca del tiempo óptimo para la recuperación de magnética, en este caso se optó por un tiempo de D1 de 5 segundos debido a que se garantiza la relajación longitudinal completa de los espines de interés, optimizando a su vez la eficiencia del análisis para el procesamiento de múltiples muestras.

El tiempo de adquisición define el periodo durante el cual el equipo registra la señal electromagnética emitida por los núcleos de la muestra, siendo la señal conocida como la caída libre de inducción, la señal que detecta. En estudios metabolómicos cuantitativos, es importante asegurar que el registro de esta señal no se interrumpa de forma brusca, ya que un FID incompleto genera artefactos durante la Transformada de Fourier, lo que compromete la forma de los picos y la fiabilidad de su integración (Claridge, 2016; Beckonert *et al.*, 2007). Para determinar el valor correcto que garantizara una recolección total de la información sin prolongar innecesariamente el tiempo de uso del equipo, se adquirieron espectros probando tres tiempos de adquisición distintos: 1.7, 2.7 y 5.4 segundos. En la figura 12 se muestran las formas del FID con diferente tiempo de adquisición. A un AQ = 1.7 y 2.7 segundos ambos tiempos resultaron insuficientes para la relajación completa del FID. Al detener la recolección de datos antes de que la señal decayera por completo hasta el nivel de ruido, el FID tuvo un fenómeno de "truncamiento". Esto se convierte en espectros con distorsiones en la línea base y la aparición de oscilaciones espurias como se

observa en la figura 13 en el espectro de color verde, alrededor de las bases de los picos más intensos, lo cual dificulta el análisis quimiométrico. A los 5.4 segundos de tiempo de adquisición, se observó que la señal del FID alcanzaba una relajación completa, disminuyendo de forma natural hasta llegar a cero. Al capturar la caída libre en su totalidad, se obtuvieron espectros limpios, con una línea base estable y picos con una forma normal, aumentando así la resolución digital del espectro.

Otro parámetro crítico es el cálculo correcto de la ganancia del receptor, este representa la amplificación de la señal original. Un valor bajo de RG dará como resultado un espectro con una mala relación señal/ruido y un valor muy alto de RG puede saturar el detector y ocurrir distorsión de la forma de las señales (Abdul-Hamid Emwas, 2019). Se evaluó adquiriendo los espectros de una muestra problema de heces de ratón sano del pool en 1:7 p/v con PBS 1x (10%D₂O). Como se observa en la figura 14, la intensidad de las señales aumenta al aumentar el valor de RG, para determinar si el valor más alto evaluado no satura la señal del detector ampliamos una zona en la región de los aromáticos (campo bajo del espectro), donde la señal de los analitos es menor, y podemos observar que la intensidad de la señal con RG=203 es mayor que el espectro obtenido con un valor de RG=64, en el espectro azul la línea base permanece estable y se mantiene la forma de la señales, por lo cual se eligió como el mejor valor de RG el 203.

Para los parámetros de procesamiento se siguieron los empleados en una investigación previa del grupo de trabajo, en el cual validaron un método para la cuantificación de metabolitos presentes en orina humana por ¹H-RMN (Zul,

2021). Donde establecieron una multiplicación exponencial de LB de 0.1 Hz, función que nos ayuda a mejorar la resolución del espectro una vez aplicada la TF. Este valor coincide con lo reportado en diversas investigaciones en metabolómica fecal por ^1H -RMN donde se aplican valores de LB de 0.1 a 0.3 Hz para incrementar la relación señal ruido sin que ocurran ensanchamiento de las líneas del espectro. En los espectros de la figura 14 y 15 se logró obtener una buena resolución espectral.

Si bien se probó el ajuste de fase automática realizada con los valores del software, no fue adecuado ya que presentaba leves distorsiones de la fase, por lo cual se optó por realizar el ajuste de forma manual empleando corrección de orden 0 y corrección de primer orden para corregir la distorsión en la fase. Posterior al ajuste de la fase, se realizó una corrección de línea base de forma automática empleando un comando propio del software TopSpin llamado ABSN que aplica un algoritmo de función polinómica a las zonas del espectro que no presentan señales logrando una línea base plana.

Debido a que el objetivo principal del estudio fue obtener un perfil metabolómico no dirigido, se realizó una validación parcial del método por RMN. Para la metabolómica de matrices biológicas complejas como las heces, se enfrentan diversos retos analíticos; uno de los principales es la dificultad de contar con un blanco de muestra libre de analitos endógenos, lo que limita de llevar a cabo una validación completa del método bajo esquemas tradicionales. Por ende, para este trabajo no se consideraron los criterios universales de la guía ICH Q2, la cual está diseñada para el control de calidad de fármacos puros, en su lugar se adoptó un enfoque adecuado al propósito, utilizando un la guía ICH

M10 sobre sobre validación bioanalítica como referencia metodológica, adaptando los criterios al carácter exploratorio de este método.

Bajo este enfoque adaptado, la confiabilidad del método se garantizó evaluando tres parámetros críticos para el modelado quimiométrico: la robustez mediante un diseño de Plackett-Burman (para asegurar la estabilidad espectral), la exactitud por adición estándar (para estimar la eficiencia de extracción disminuyendo los efectos de matriz) y la precisión (para garantizar la reproducibilidad del perfil). Específicamente para la precisión, se adoptó el criterio de aceptación bioanalítico estipulado en la propia ICH M10, el cual establece como límite razonable para matrices biológicas un $\%DER \leq 15\%$ (permitiendo hasta un $\leq 20\%$ en los límites inferiores). El cumplimiento de este criterio asegura que la variabilidad observada en los datos previene de diferencias biológicas y no del método analítico.

La precisión del método se evaluó mediante el $\%DER$ de la respuesta de tres señales de los espectros obtenidos que abarcaran la ventana espectral adecuada, siendo elegida la señal a 1.4 ppm (región alifática), a 5.2 ppm (región anomérica y protones alfa-amino) y 7.5 ppm (región aromática). Para la precisión intradía se obtuvo $\%DER$ de 4.23 a 9.38% y para precisión intermedia $\%DER$ para la señal de 1.4 de 6.16% a 13.5%, para la señal a 5.2 ppm de 1.88% a 4.23%, y para la señal de 7.5 ppm de 6.03 a 11.66%. De acuerdo con la guía ICH Q2 (Guideline, 2025) el criterio general de aceptación para la precisión establece que el $\%DER$ no debe exceder el 15% (permitiéndose hasta el 20% en el límite inferior de cuantificación).

Para evaluar la exactitud se realizó un ensayo de adición estándar, añadiendo una alícuota de estándar de fenilalanina a las muestras de heces de ratones sanos y se calculó el porcentaje de recuperación de forma indirecta con la formula recomendada por la ICH para recuperación en muestras con analitos endógenos. La elección de la fenilalanina como analito para esta prueba tuvo un doble propósito analítico y fisicoquímico. Por su estructura química tiene señales aromáticas (entre 7.3 – 7.4 ppm) y estas se encuentran bien resueltas y evitan el severo solapamiento espectral de la región alifática (Deda, G. Gika, Wilson, & Theodoridis, 2015). Biológicamente, la fenilalanina es un aminoácido de alto interés en la enfermedad de Parkinson, al ser el precursor primario de la tirosina y, por lo tanto, de la biosíntesis de dopamina, vinculando su alteración fecal con el eje intestino-cerebro (Shao, y et al., 2021)

Se obtuvieron recuperaciones del 73 al 78% para el estándar añadido de fenilalanina, lo cual muestra la eficiencia de la recuperación del método más que un valor de exactitud absoluto del todo el perfil. Estos valores reflejan el fuerte 'efecto matriz' que tienen los extractos de heces, donde los metabolitos endógenos pueden tener un efecto físico donde los restos de macromoléculas no digeridas adsorben o atrapan los analitos durante la extracción y centrifugación, limitando una mejor extracción total (Vignoli, et al., 2018). No obstante, en la metabolómica no dirigida, la reproducibilidad en el proceso de extracción pudiera ser más crítica que la recuperación absoluta. La variabilidad entre las réplicas observada fue mínima (%DER < 3%), lo que demuestra que la retención de la matriz es un fenómeno sistemático y predecible. Considerando el método de extracción de alta reproducibilidad que confirma que la varianza analítica del

método es despreciable en comparación con la variabilidad biológica, garantizando que las posibles señales de discriminación identificados por las herramientas multivariantes corresponden a auténticas alteraciones inducidas por el modelo de EP.

Para la evaluación de la robustez se desarrolló un diseño de experimentos de Plackett-Burman por su eficiencia estadística, ya que permite evaluar los efectos principales de múltiples variables que involucran el método o el sistema de forma simultánea usando un número mínimo de corridas experimentales. La elección de los factores estudiados se basó en los puntos críticos del tratamiento y procesamiento en el análisis metabolómico por RMN. En la etapa de tratamiento de la muestra se eligió el volumen de disolvente utilizado, debido al impacto que tendría en la relación p/v y la influencia del pH, que interviene en la capacidad amortiguadora y la fuerza iónica, y alterar la eficiencia de la extracción en la matriz fecal (Wu, An, Yao, Wang, & Tang, 2010). Respecto a las condiciones instrumentales, se evaluó la temperatura de adquisición debido a que pequeñas alteraciones térmicas influyen en los tiempos de relajación y los desplazamientos químicos, comprometiendo la homogeneidad del campo y el ancho de línea espectral. Asimismo, se incluyó el tiempo de mezclado (D8) por ser un parámetro que interviene en la secuencia de pulso noesygppr1d, donde una variación puede afectar de forma drástica la saturación del agua residual y disminuir las señales de los metabolitos cercanos por transferencia cruzada de magnetización (Beckonert, 2007).

Las señales elegidas para la evaluación de la robustez fueron las siguientes: a 1.4, 5.2 y 7.5 ppm, así cubrimos la ventana espectral de interés,

cubriendo la zona donde observamos los protones alifáticos, zona anomérica y la zona aromática, en la tabla 9 podemos ver los resultados obtenidos. Se obtuvieron los valores de R^2 , Q^2 , ANOVA y el diagrama de Pareto para cada señal evaluando los tres factores. En este caso el coeficiente de determinación (R^2) cuantifica la variabilidad de la respuesta que pueda ser explicada por los cambios deliberados en los factores estudiados, se busca que tener un valor bajo de R^2 ya que indicaría que el modelo no logra correlacionar los factores con la respuesta. El coeficiente de predicción (Q^2) busca explicar la capacidad predictiva del modelo, un valor negativo indica que el modelo no tiene esta capacidad predictiva para nuevos datos.

Se obtuvieron valores de R^2 y Q^2 bajos, un valor de $p > 0.05$ no significativo para las señales en 1.4 y 5.2 ppm. Además, esto se comprueba con el diagrama de Pareto donde ninguno de los factores cruza el límite crítico para la significancia. Mientras que para la señal a 7.5 ppm también se obtuvieron valores bajos de R^2 y Q^2 y un valor de p no significativo excepto para la variación de volumen.

Al tener valores de Q^2 negativos para las tres señales analizadas, nos indica que las perturbaciones probadas no sobrepasan el error aleatorio del proceso, confirmando que no hay variación en la respuesta frente a la alteración menor. Al analizar la señal a 1.4 ppm se observó ausencia de significancia estadística ($p > 0.05$) frente a los cambios de temperatura, tiempo de mezcla y volumen de PBS (10% D_2O). Para la señal a 5.2 ppm que es la zona que representativa de protones de carbohidratos, suele ser influenciado a fluctuaciones instrumentales debido a su proximidad al área de la señal de agua.

Sin embargo, el bajo ajuste del modelo $R^2 = 0.2564$ y la nula significancia de las variables validan la eficacia de la secuencia de pulso empleada. Estos resultados demuestran que los gradientes y pulsos de presaturación mantienen una supresión del disolvente altamente reproducible sin comprometer las señales adyacentes al alterar el parámetro instrumental D8 (Beckonert, 2007). Sin embargo, en la zona aromática (7.5ppm) la variación del volumen del disolvente presentó un efecto estadísticamente significativo. Al ser una de las señales de baja intensidad del espectro, la cantidad de disolvente añadida puede influir el factor de dilución sobre esta respuesta. Por lo cual se recomienda tener un control crítico del volumen de disolvente en el proceso de tratamiento de muestra. Considerando el método robusto para las demás variables instrumentales probadas.

Por medio de análisis multivariable se determinó si había diferencias entre los perfiles metabolómicos y para asegurar que las variabilidades encontradas correspondieran a las señales, se requirió de un tratamiento previo de los datos espectrales. Una vez importados los datos en el software Matlab, se determinaron las áreas del espectro que no aportaban información relevante, como los extremos del espectro de 0.00 – 0.5; 8.5 a 12.00 ppm y fueron eliminadas, después de recortados los espectros fueron corregidos mediante el algoritmo iCoShift para alinear el ligero corrimiento del desplazamiento químico de las señales que ocurre debido a la variación propia de las muestras biológicas.

El primer modelo de PCA se construyó con la finalidad de comparar distintos esquemas de pretratamiento de los datos aplicando primeramente una normalización y centrado a la media. Se obtuvo el gráfico de scores inicial con

todas las muestras (Fig. 26) y requirió de 5 componentes principales para explicar la varianza, la PC1 explicó el 83.72%, PC2 5.67%, PC3 3.68%. Fue predominante la PC1, indicando que la conformación del modelo está explicada por una fuente global de variación, esto puede relacionarse con efectos de las muestras fecales como la variabilidad del contenido de agua, diferencias en las concentraciones de los metabolitos, desviaciones de la línea base, entre otras. Además, se observa que no hay una separación clara entre los grupos de las muestras, viendo una superposición de los puntos. Por lo cual se consideró ampliar el pretratamiento de los datos. El siguiente modelo de PCA se construyó añadiendo la corrección de línea base observando un mejor resultado aplicando el orden trinomial, normalización, centrado a la media y escalado de Pareto a los datos. En el modelo (Fig. 27) podemos ver que la varianza total se distribuye de forma más equilibrada en las 3 PC que se obtuvieron (32.99%, 20.63% y 11.50%). El cambio indica que los pretratamientos adicionales redujeron el dominio de las señales más intensas y permitieron que regiones de intensidad intermedia contribuyeran a la estructura del modelo; además se redujeron las variaciones instrumentales al corregir la línea base. Por lo tanto, la normalización (PQN), la corrección de línea base, el centrado a la media y el escalado de Pareto fue considerado el pretratamiento más adecuado para los datos. Algunas muestras anómalas fueron detectadas en el gráfico de la distribución T^2 frente residuos Q (Fig. 28). La muestra identificada como P404 y P404B presentan valores de T^2 mayores que el límite de confianza, pero residuos Q relativamente bajos, esto indica una alta influencia en la varianza del modelo. Es importante mencionar que la muestra "B" es un duplicado de la muestra P404, considerándose un indicador

de la reproducibilidad del patrón mostrado al localizarse juntos en el gráfico de scores.

El análisis exploratorio mediante PCA permitió evaluar la integridad quimiométrica de los perfiles metabólicos obtenidos por ^1H -RMN. La evaluación sistemática de los residuales Q, los cuales miden la fracción de la varianza ortogonal no explicada por el modelo, mostró valores anómalos en adquisiciones específicas (ej. P604, C801). En la metabolómica de extractos fecales, un residual Q elevado es indicativo de varianza estructurada ajena al fenotipo biológico, originada por la extrema complejidad de la matriz, diferencias de masa extraída por presencia de sólidos en la muestra o pequeñas variaciones de pH que alteran las señales de los metabolitos. Para garantizar que el modelo reflejara estrictamente la perturbación patológica, se procedió a la exclusión de las muestras atípicas (P404, P404B, P701, P801, P801B, C605 y C606), algunas de ellas por error analítico (adquisición espectral) o cantidad de materia fecal extraída. La exclusión de estas muestras disminuyó el ruido analítico y resultó en un modelo de PCA final con 29 muestras (Fig. 30), la varianza total explicada alcanzó un 68.58%, distribuida en los primeros tres componentes (PC1: 37.43%; PC2: 21.46%; PC3: 9.69%).

Observándose una tendencia más clara en este modelo respecto a la distribución de las muestras, el grupo control se distribuye predominantemente hacia valores positivos de PC1, mientras que el grupo del modelo de EP se distribuye hacia valores negativos.

La evaluación del gráfico de *loadings* demuestra que la varianza principal del modelo biológico no se debe a alteraciones aleatorias, sino a una alteración

en el perfil de AGCC y de metabolitos derivados de la microbiota. Específicamente, la variable fuertemente positiva del PC1 está dominado por la señal a 1.92-1.93 ppm, característica del grupo metilo del acetato, así como por regiones en 0.9-1.1 ppm y 1.4-1.7 ppm, que corresponden a los protones alifáticos del butirato, propionato y aminoácidos de cadena ramificada. Al mismo tiempo, la reducción en las señales de 3.2-4.0 ppm sugiere alteraciones en el metabolismo de la taurina, la colina y el recambio de ácidos biliares, solidificando el fenotipo de disfunción entérica.

La aplicación del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) permitió evaluar la capacidad de los perfiles metabólicos fecales para predecir el efecto de la exposición a paraquat en el grupo del modelo murino con EP. En el modelo inicial, la separación supervisada a lo largo de la VL1 demostró que las muestras del grupo control se agrupan en la región negativa y las muestras del grupo del modelo de EP en la región positiva (Fig. 32). Utilizando un umbral de decisión de 0.4 para los scores de pertenencia a la clase control, se obtuvo una sensibilidad de 0.769 y una especificidad de 0.913 ($R^2 = 0.516$). La presencia de muestras mal clasificadas (C102, C605, C606 por debajo del umbral; P701 por encima) no se consideró un fallo analítico, sino un reflejo de la heterogeneidad del microbioma murino entre los sujetos. Como reportan estudios recientes sobre el eje intestino-cerebro en modelos de EP, la composición basal de la microbiota presenta una notable variabilidad entre individuos. Este podría generar perfiles metabólicos y fenotípicos intermedios frente a alteraciones en este eje, evidenciando que el estado microbiológico inicial de cada sujeto condiciona su respuesta a la enfermedad (Sampson, et al., 2016)

Para caracterizar la separación entre clases sin la influencia de la heterogeneidad de algunas muestras, se construyó un modelo reducido excluyendo las muestras confusas (n=32). Este modelo optimizado explicó el 47.12% de la varianza espectral (X) y el 81.30% de la respuesta de clase (Y) utilizando dos variables latentes (Fig. 34), mejorando el R^2 de validación cruzada a 0.714 (Fig. 33, B). La evaluación de los *loadings* del LV1 reveló mínimos muy intensos en 1.93 ppm y regiones de 0.9-1.1, 1.4-1.7, 2.1-2.4 y 3.2-4.0 ppm.

El análisis de Importancia de Variables en la Proyección confirmó estadísticamente estas observaciones. La señal a 1.93 ppm, correspondiente al acetato, dominó ampliamente el modelo con un VIP excepcional cercano a 19. La presencia de múltiples variables continuas con $VIP > 1$ refleja las señales de los AGCC como butirato y propionato. Dado que el pico dominante a 1.93 ppm posee un *loading* negativo (asociado al grupo control en el LV1), se concluye que la exposición a paraquat para la inducción de la EP produce una disminución de estos metabolitos. Este comportamiento es congruente con la patogénesis de la EP, donde la pérdida de bacterias productoras de AGCC compromete la barrera epitelial y promueve la inflamación sistémica y la neurodegeneración (Song et al., 2023; Cannas et al., 2024).

El análisis ortogonal aportó información crucial sobre la dinámica microbiana individual. Las adquisiciones P404/P404B, aunque localizadas en la región del grupo control del LV1, mostraron un LV2 marcadamente positivo, impulsado por una contribución anormalmente alta de la señal de acetato a 1.93 ppm. Finalmente, la evaluación del poder predictivo mediante curvas ROC reportó un Área Bajo la Curva de 1.000 tanto en estimación como en validación

cruzada, indicando una ordenación correcta de las respuestas predichas. A pesar de este valor ideal, la especificidad y sensibilidad en el punto de corte (0.955) revelan que la clasificación no es absoluta para todos los umbrales.

En resumen, los resultados nos muestran que la exposición a paraquat como un agente neurotóxico en el modelo murino de EP altera severamente el metaboloma intestinal de los ratones, caracterizado por una marcada reducción espectral de ácidos grasos de cadena corta (posiblemente el acetato y butirato) y compuestos del metabolismo de carbohidratos. Aunque el presente estudio está delimitado al perfilado metabólico, la disminución de estas señales que concuerdan con las regiones espectrales de ^1H de metabolitos con los ácidos grasos de cadena corta, puede considerarse como un posible marcador indirecto reconocido de la disbiosis inducida por toxinas. Se ha postulado que la falta de estos ácidos grasos protectores contribuye a la disfunción de la barrera intestinal y facilita la inflamación sistémica que, a través del eje intestino-cerebro, favorece al desarrollo de la EP (Duan, Wang, Liu, & Liu, 2023).

Finalmente, con esta investigación, se logró establecer el tratamiento de muestra adecuado de heces de ratón para su análisis por RMN, así como los parámetros de adquisición para obtener el perfil metabolómico en heces del modelo murino de EP, con los datos recolectados y mediante las herramientas de reconocimiento de pautas como el PCA y el PLS-DA se obtuvo, como primera aproximación debido al reducido número de muestras, las variables diferenciadoras como posibles metabolitos que hacen la separación entre los grupos de estudio analizados. Y por lo tanto se considera un protocolo de partida para continuar los estudios tanto en modelos animales experimentales de EP

como en estudios de humanos con la finalidad de ser una herramienta en el diagnóstico de la EP.

Al tratarse de un estudio exploratorio basado en RMN unidimensional, y dada la complejidad visual que tienen las señales en las muestras fecales en el espectro, estas asignaciones son todavía una aproximación inicial. Para poder confirmar los metabolitos propuestos se deben realizar experimentos bidimensionales para confirmar las estructuras moleculares.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES

- Se estableció un método preciso y robusto por ^1H -RMN para la obtención del perfil metabolómico de heces de ratón de un modelo murino de enfermedad de Parkinson.
- El modelo de PCA permitió seleccionar un preprocesamiento espectral adecuado, con estas condiciones se observó una tendencia de separación entre el grupo control y de enfermedad de Parkinson.
- Los resultados obtenidos con los modelos de análisis multivariante mostraron diferencias entre los perfiles metabolómicos de los grupos evaluados concordando con la hipótesis planteada.
- Se propusieron como posibles metabolitos diferenciadores a los ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato, propionato), aminoácidos ramificados como la valina además de algunos otros como la alanina, y glucosa como los posibles metabolitos que marcan la diferencia entre los grupos de estudio.
- La exposición a paraquat se asocia con estrés oxidativo sistémico y puede modificar la función intestinal y la microbiota, reduciendo los niveles de

ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos, coincidiendo con el patrón observado en el modelo propuesto.

- Dado el número reducido de sujetos en estudio, el modelo se considera una aproximación inicial para el establecimiento del perfil metabolómico y la identificación de señales diferenciadoras.

CAPÍTULO 6

6 PERSPECTIVAS

- Ampliar los grupos experimentales para dar mayor validez al modelo estadístico.
- Evaluar los grupos del modelo murino expuestos a los inductores de autofagia en los que se disminuyó el daño provocado por el paraquat.
- Confirmar los metabolitos diferenciadores propuestos, así como establecer una validación cuantitativa por RMN.
- Implementar el método en muestras fecales de pacientes con EP para obtener el perfil metabolómico fecal, y adaptar la metodología en otras matrices como suero o plasma para correlacionar el patrón observado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Hamid Emwas, R. R. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 123. doi:10.3390/metabo9070123
- Beckonert, O. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2(11), 2692-2703. doi:10.1038/nprot.2007.376
- Bhinderwala, F., Lei, S., Woods, J., Rose, J., Marshall, D. D., Riekeberg, E., . . . Powers, R. (2019). Metabolomics Analyses from Tissues in Parkinson's disease. *Methods Mol Biol.*, 217-257. doi:10.1007/978-1-4939-9488-5_19
- Blanco, M., & Cerdá Martín, V. (1988). *Quimiometría*. Valencia : Universitat de València.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R., Jansen Steur, E., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197-211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9
- Claridge, T. D. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford: Elsevier.
- Deda, O., G. Gika, H., Wilson, I., & Theodoridis, G. (2015). An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137-150. doi:10.1016/j.jpba.2015.02.006

- Dorsey, E. R., & Bloembergen, B. R. (2024). Parkinson's Disease Is Predominantly an Environmental Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 14, 451-465. doi:10.3233/JPD-230357
- Duan, W.-X., Wang, F., Liu, J.-Y., & Liu, C.-F. (2023). Relationship Between Short-chain Fatty Acids and Parkinson's Disease: A Review from Pathology to Clinic. *Neurosci Bull*, 40(4), 500-516. doi: 10.1007/s12264-023-01123-9
- Elizondo, G. C., Dector, M. A., Martínez, H. R., Martínez, L. d., & Esmer, M. S. (2011). Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades. *Medicina Universitaria, Elsevier*, 13(51), 96-100.
- Erben, V., Poschet, G., Schrotz King, P., & Brenner, H. (2021). Evaluation of different stool extraction methods for metabolomics measurements in human faecal samples. *BMJ Nutr Prev Health*, 374-384. doi:10.1136/bmjnp-2020-000202
- EUROLAB. (2014). *Guide to NMR Method Development and Validation – Part I: Identification and Quantification (Reporte Técnico No. 01/ 2014)*. Bruselas: EUROLAB General Secretariat.
- F. Savorani, G. T. (2010). icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J. Magn. Reson.*, 202: 190-202. doi:10.1016/j.jmr.2009.11.012
- Gopar Cuevas, Y., Duarte-Jurado, A. P., Diaz Perez, R. N., Saucedo Cardenas, O., Loera Arias, M. J., Montes de Oca Luna, R., . . . García García, A. (2021). Pursuing multiple biomarkers for early idiopathic Parkinson's disease diagnosis. *Molecular Neurobiology*, 58(11), 5517-5532. doi:10.1007/s12035-021-02500-z

- Gopar-Cuevas, Y., Saucedo-Cardenas, O., Loera Arias, M. J., Montes de Oca Luna, R., Rodriguez-Rocha, H., & García-García, A. (2023). Metformin and Trehalose-Modulated Autophagy Exerts a Neurotherapeutic Effect on Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 60(12), 7253-7273. doi:10.1007/s12035-023-03530-5
- Guideline, I. H. (2025). *Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R2)*. T: S.
- Hauser, A., Eisenmann, P., Muhle, C. G., Burkhard, L., Dötsch, A., Graf, D., & Tzetskova, P. (2019). Efficient Extraction from Mice Feces for NMR Metabolomics Measurements with Special Emphasis on SCFAs. *metabolites*, 1-19.
- Jacobs, D. M., Deltimple, N., van Velzen, E., van Dorsten, F. A., Bingham, M., Vaughan, E., & van Duynhoven, J. (2008). ¹H NMR metabolite profiling of feces as a tool to assess the impact of nutrition on the human microbiome. *NMR Biomed*, 21, 615-626.
- James N. Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Jeffrey R. Idle, F. J. (2007). Metabolomics. *Cell Metabolism*, 6(5), 348-351. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.005.
- Lapaquette, P., Baptise Bizeau, J., Acar, N., & Bringer, M. A. (2021). Reciprocal interactions between gut microbiota and autophagy. *World Journal of Gastroenterology*, 27(48), 8283-8301. doi:10.3748/wjg.v27.i48.8283
- Lucio-Gutiérrez, J., Cordero-Pérez, P., Ávila-Velázquez, J., Torres-González, L., Farías-Navarro, I., Govea-Torres, G., . . . Saucedo, A. (2024). Targeted and

- untargeted serum NMR metabolomics to reveal initial kidney disease in diabetes mellitus. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 116240. doi:10.1016/j.jpba.2024.116240
- Lucio-Gutiérrez, J., Cordero-Pérez, P., Farías-Navarro, I., Tijerina-Marquez, R., Sánchez-Martínez, C., Ávila-Velázquez, J., . . . Saucedo, A. (2022). Using nuclear magnetic resonance urine metabolomics to develop a prediction model of early stages of renal disease in subjects with type 2 diabetes. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 114885. doi:10.1016/j.jpba.2022.114885
- Matysik, S., Le Roy, C., Liebisch, G., & Claus, S. (2016). Metabolomics of fecal samples: a practical consideration. *Trends in Food Science & Technology*, 1-50. doi:10.1016/j.tifs.2016.05.011
- Mckay, R. T. (2011). How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. Concepts in Magnetic Resonance Part A. *Wiley*, 38(5), 197-220. doi:10.1002/cmr.a.20223
- Moco, S. (2022). Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 882487. doi:10.3389/fmolb.2022.882487
- Monakhova, Y., & Diehl, B. (2017). Practical guide for selection of ¹H qNMR acquisition and processing parameters confirmed by automated spectra evaluation. *Magn Reson Chem.*, 996-1005. doi:10.1002/mrc.4622
- Muhammad Aminu, N. A. (2020). Complex Chemical Data Classification and Discrimination Using Locality Preserving Partial Least Squares

- Discriminant Analysis. *ACS Omega*, 206601-26610. doi:10.1021/acsomega.0c03362
- Nagana Gowda, G. A. (2021). NMR-Based Metabolomics. *Advances in experimental medicine and biology*, 19-37. doi:10.1007/978-3-030-51652-9_2
- Ostrakhovitch, E. A., Ono, K., & Yamasaki, T. R. (2025). Metabolomics in Parkinson's Disease and Correlation with Disease State. *Metabolites*, 15, 208. doi:10.3390/metabo15030208
- Pardo Rafael, B. E. (1988). Métodos reconocimiento de pautas. En C. V. Blanco M., *Quimiometría* (págs. 169-203). Valladolid: AEST.
- Ramírez Moreno, M. J. (2016). *Análisis del efecto de la inducción de autofagia en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson*. Mty: UANL. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/14183/1/1080237907.pdf>
- Sampson, T., Debelius, J., Thron, T., Janssen, S., G. Shastri, G., Esra Illhan, Z., . . . Mazmanian, S. (2016). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, 167(6), 1469-1480. doi:doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018
- Santosh Kumar Bharti, R. R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5-26. doi:10.1016/j.trac.2012.02.007.
- Santosh Lamichhane, C. C. (2015). Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces. *Analytical chemistry*(87), 5930 - 5937. doi:10.1021/acs.analchem.5b00977
- Shao, Y., Li, T., Liu, Z., Wang, X., Xu, X., Li, S., . . . Le, W. (2021). Comprehensive metabolic profiling of Parkinson's disease by liquid chromatography-mass

- spectrometry. *Molecular Neurobiology*, 16(1), 174-187.
doi:doi.org/10.1186/s13024-021-00425-8
- Silverstein, R. M. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Sui, H., Qin, R., Li, C., Guodong, X., & Yuxiang, W. (2024). Advances in animal models of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, 111024. doi:10.1016/j.brainresbull.2024.111024
- Tolosa, E., Garrido, A., W Scholz, S., & Werner, P. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 20(5), 385-97. doi:10.1016/S1474-4422(21)00030-2
- Trifonova, O. P. (2020). Parkinson's Disease: Available Clinical and Promising Omics Tests for Diagnostics, Disease Risk Assessment, and Pharmacotherapy Personalization. *Diagnostics*, 339. doi:10.3390/diagnostics10050339
- Vignoli, A., Ghini, V., Meoni, G., Licari, C., Takis, P., Tenori, L., . . . Luchinat, C. (2018). High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Wiley*, 58(4), 968-994. doi:doi.org/10.1002/anie.201804736
- Wasim, B., & Shinde, N. (2025). A Review on Treatment of Parkinson`S Disease. *Int. J. of Pharm. Sci.*, 3(4), 3356-3365. doi:10.5281/zenodo.15307778
- Wu, J., An, Y., Yao, J., Wang, Y., & Tang, H. (2010). An optimised sample preparation method for NMR-based faecal metabonomic analysis. *Analyst*, 135(5), 1023-30. doi:10.1039/b927543f
- Zafar, S., & Yaddanapudi., S. S. (07 de Aug de 2025). *Parkinson Disease*. Obtenido de StatPearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470193/>

- Zhang, X., Tang, B., & Guo, J. (2023). Parkinson's disease and gut microbiota: from clinical to mechanistic and therapeutic studies. *Translational Neurodegeneration*, 12-59. doi:10.1186/s40035-023-00392-8
- Zul, E. (2021). *Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de metabolitos presentes en la orina humana por resonancia magnética nuclear de hidrógeno*. Mty: UANL.