



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS
INSTITUTO DE FÍSICA

ANÁLISIS DE METABOLITOS PRESENTES EN EL ALIENTO:
DETERMINACION DE LA LÍNEA BASAL.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:
ANA MARÍA GALLEGO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. ANTONIO MARCELO JUÁREZ REYES
Instituto de Ciencias Físicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Jesús Flores Mijangos - Instituto de Ciencias Nucleares
Dr. Rubén Yvan Maarten Fossion - Instituto de Ciencias Nucleares
Dra. Adriana Monroy - Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. (MES EN QUE SE REALIZA EL EXAMEN) 2016

RESUMEN

En la presente tesis se desarrolló e implementó un protocolo de toma de muestra y un sistema de análisis de muestras de aliento exhalado, con el objeto de definir una línea basal de metabolitos que permitan contrastar pacientes sanos de enfermos de diabetes.

El análisis de compuestos orgánicos presentes en el aliento, requiere la determinación de la línea basal de la población sana, a partir de la cual se pueda contrastar los casos patológicos. En particular, el presente estudio tiene como objetivo sentar las bases para el estudio posterior, enfocado al diagnóstico no invasivo de diabetes en estadios tempranos.

En este proyecto se analizaron muestras del aliento exhalado de 27 pacientes sanos, 3 pacientes diabéticos de reciente diagnóstico y 5 en estado crítico. El estatus fisiológico de los pacientes fue determinado por el grupo de medicina interna del hospital general de México (HGM). Para el análisis del aliento, se desarrolló un sistema de toma de muestras de aliento y pre-concentración de los metabolitos en cartuchos adsorbedores. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-SM).

Los resultados mostraron un total de 92 compuestos orgánicos presentes en el aliento exhalado de pacientes sanos y diabéticos. Se determinó la línea basal de compuestos presentes en el aliento con base a 20 metabolitos que presentaron significativas diferencias en los errores estándares de ambas poblaciones. El análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos en la población total, mostró una clara correlación de 9 biomarcadores con la patología diabética.

ABSTRACT

In this work, we developed and implemented a system of sample collection and analysis of samples of human exhaled breath. The purpose of this was to define a baseline of selected biomarkers present in the human breath, and which may help to discriminate healthy from diabetic patients.

The analysis of organic compounds present in the human breath, requires the determination of the baseline on the healthy population, this baseline should enable us to find differences in pathological cases. In particular, this study aims to determine the methodological basis for further study of non-invasive diagnosis of diabetes in early stages.

In this project samples of exhaled breath of 27 healthy patients, 3 patients newly diagnosed diabetics and 5 in critical condition are analyzed. The physiological status of patients was determined by the group of internal medicine in of the Hospital General de Mexico (HGM). For breath analysis, a system for sampling breath and pre-concentration of metabolites in adsorbent tubes was developed. Subsequently, the samples were analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS).

The results showed a total of 92 organic compounds in the exhaled breath of healthy and diabetic patients. Baseline of compounds present in the wind was determined based on 20 metabolites that showed significant differences in the standard errors of both populations. The principal component analysis (PCA) of the metabolites of the total population, showed a clear correlation with biomarkers of diabetic pathology.

CONTENIDO

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	7
CAPITULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	9
2.1 Planteamiento del problema	9
2.2 Hipótesis	10
2.3 Justificación	11
2.4 Objetivo General.....	11
2.5 Objetivos Específicos	12
CAPITULO 3: ANTECEDENTES	13
3.1 Metabolismo y Respiración.....	13
3.1.1 Metabolismo Del Cuerpo Humano.....	14
3.1.2 Mecánica respiratoria	17
3.2 Metabolitos en el aliento y patologías identificables.....	21
3.2.1 Compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en el aliento	21
3.2.2 Patología diabética	25
3.2.3 Antecedentes del análisis del aliento en la detección de la diabetes	28
CAPITULO 4: FUNDAMENTOS TEORICOS	31
4.1 Técnicas para el análisis del Aliento Humano.	31
4.1.1 Técnicas basadas en cromatografía de gases	32
4.1.2 Técnicas químicas.	36
4.1.3 Técnicas basadas en espectroscopia láser.	40
CAPITULO 5: METODOS Y PROCEDIMIENTOS	45
5.1 Pruebas piloto de CG-SM.....	45
5.1.1 Preconcentración de VOC's y eliminación de la humedad del aliento..	46
5.1.2 Pruebas en el cromatógrafo de gases.	47

5.2 Caracterización fisiológica de la población.	48
5.3 Protocolo Toma de muestras de aliento en el HGM.....	50
5.3.1. Preparación de los pacientes y materiales.....	50
5.3.2 Acondicionamiento de cartuchos multilecho.....	51
5.3.3 Toma de muestra de aliento	51
5.3.4 Preconcentración de muestras en tubos adsorbentes	52
5.3.5 Limpieza de bolsas tedlar.....	53
5.4 Análisis del Aliento por CG-SM	53
5.4.1 Análisis de muestras en el Cromatógrafo de gases Agilent 7890	54
5.4.3 Identificación de metabolitos presentes en el aliento	55
5.4.4 Cuantificación indirecta e integración de los compuestos	56
5.6 Análisis de datos.....	57
5.6.1 Caracterización fisiológica de pacientes.....	57
5.6.2 Compuestos presentes en el aliento	58
5.6.3 Análisis de componentes principales (PCA)	59
CAPITULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1 Caracterización fisiológica de pacientes	60
6.1.1 Glucosa promedio en sangre o posprandial de 2 horas.	60
6.1.2 Curva de tolerancia a la glucosa.....	62
6.1.3 Hemoglobina glicosilada	63
6.1.4 Otros parámetros: IMC, Colesterol y triglicéridos.....	64
6.2 Metabolitos presentes en el aliento	66
6.3 Determinación de la línea basal	71
6.4 Análisis de componentes principales (PCA)	72
CAPITULO 7: CONCLUSIONES	78
8. BIBLIOGRAFIA.....	79

ANEXOS.....	85
PLANTILLA DE DATOS PERSONALES Y ANTECEDENTES	85
EVALUACIÓN LIMPIEZA DE BOLSAS TEDLAR	86
INDICE DE FÍGURAS, TABLAS Y ECUACIONES.....	88

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

El estudio de metabolitos presentes en el aliento es una herramienta útil para el análisis de múltiples patologías (A. Amann et al. 2014). Los metabolitos son compuestos orgánicos que participan en el proceso metabólico debido a cambios químicos, físicos y biológicos que ocurren en las células (A. Garrido, et al 2001). Por ende, la identificación, cuantificación y análisis de metabolitos presentes en el aliento proporciona información muy valiosa sobre la bioquímica y metabolismo del cuerpo humano.

Existen múltiples técnicas espectroscópicas (C. Wang et al. 2009) dedicadas al estudio exhaustivo de metabolitos asociados a diversas patologías (enfermedades renales, hepáticas, cáncer, diabetes, entre otras). Estas técnicas permiten identificar y cuantificar la concentración de diferentes metabolitos, de forma precisa y con límites de detección en el rango de ppmv (partes por millón volumétrica) hasta pptv (Partes por trillón volumétrica).

En general, los métodos clínicos que usualmente se implementan para el diagnóstico y monitoreo de múltiples patologías, involucran pruebas invasivas y dolorosas. El análisis de compuestos orgánicos (VOC's) presentes en el aliento, es una herramienta útil ya que otorga la posibilidad de brindar un diagnóstico oportuno y el seguimiento y control de múltiples enfermedades de manera no invasiva para el paciente.

En particular, el presente estudio tiene como objetivo sentar las bases para un estudio posterior, enfocado al diagnóstico no invasivo de diabetes en estadios tempranos. Para lograr esto, es necesario establecer la línea basal de la población sana, a partir de la cual se podrán contrastar casos patológicos. La diabetes es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente 346 millones de personas en el mundo (Federation, 2012). En México 6.4 millones de personas han sido diagnosticadas como diabéticas, presentándose con mayor prevalencias en los estados de: Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis

Potosí. Cabe destacar que la diabetes se encuentra entre las primeras causas de muerte para este país (ENSANUT, 2012).

En el año 2006 únicamente 5.3% de las personas con diabetes en México presentaron un adecuado control de la enfermedad (ENSANUT, 2012). La norma NOM 015-SSA2- 2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus indica que las mediciones de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) y microalbuminuria deberán realizarse una vez al año (NOM-015-SSA2, 2010). Es evidente que el monitoreo actual dista mucho de la norma, lo cual se refleja en el bajo control de la enfermedad que se observa actualmente en México.

Para ayudar a solucionar esta problemática, en la tesis presente se propone iniciar la base metodológica de un método no invasivo para el análisis de metabolitos presentes en el aliento. En este estudio, concretamente, se realizó un protocolo de toma de muestras de aliento y se desarrolló un sistema de muestreo de la población y captura de los VOC's en tubos multilecho. Se llevó a cabo un estudio exhaustivo de los compuestos moleculares presentes en el aliento exhalado de pacientes sanos y una muestra selecta de pacientes con diabetes y se identificaron potenciales metabolitos que proporcionan una línea basal para futuros estudios que amplíen este estudio inicial. El sistema de análisis de metabolitos se probó en pacientes sanos y diabéticos. El estatus fisiológico de los voluntarios de la prueba fue determinado por la Dra. Adriana Monroy Guzmán y colaboradores en el Hospital General México (HGM). Las muestras de aliento fueron trasladadas al Centro de ciencias de la atmosfera (CCA) de la UNAM, para su posterior análisis mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-SM). Seguidamente, se identificaron y cuantificaron indirectamente los compuestos con las librerías del software ChemStation de Agilent Technologies, y se corroboraron, como prueba cruzada, algunos compuestos identificados mediante la inyección de estándares gaseosos. Finalmente se realizó el análisis estadístico de los compuestos presentes en ambas poblaciones. Este trabajo detalla los procedimientos, métodos y conclusiones más importantes obtenidas como parte del desarrollo metodológico anteriormente mencionado.

CAPITULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

2.1 Planteamiento del problema

Hoy en día los medios de diagnóstico y detección temprana de muchas patologías involucran métodos invasivos y dolorosos en los pacientes. No obstante el seguimiento de la evolución de las enfermedades sugiere la implementación constante de estos métodos clínicos. Aunque el análisis del aliento es una herramienta muy poderosa para la detección temprana y monitoreo de muchas enfermedades, es una técnica que aún no se ha explorado intensamente. Analizar los biomarcadores de enfermedades y conocer las concentraciones anormales en personas enfermas, implica conocer previamente las concentraciones de los compuestos en personas sanas, sus variabilidades y correlaciones estadísticas.

Aunque hay muchas posibilidades de patologías en las cuales sería deseable implementar métodos no invasivos basados en el aliento exhalado, en este trabajo se ha elegido la diabetes. La diabetes representa una de las principales causas de muerte en México, la encuesta nacional de salud y nutrición informa que 6.4 millones de personas han sido diagnosticadas como diabéticas, y se estima que el total de personas podría ser el doble debido a que no conocen su condición.

México también se posiciona como el sexto país en el mundo (figura 2.1) con mayor población diabética (Federation, 2012). Esta enfermedad representa para México un gasto aproximadamente 3,430 millones de dólares al año para su detección, seguimiento y control (ENSANUT, 2012). Este costo económico no refleja el costo humano, laboral y afectivo que implica esta grave patología para la población de nuestro país.

Los 10 principales países/territorios por número de personas con diabetes (20-79 años), 2013

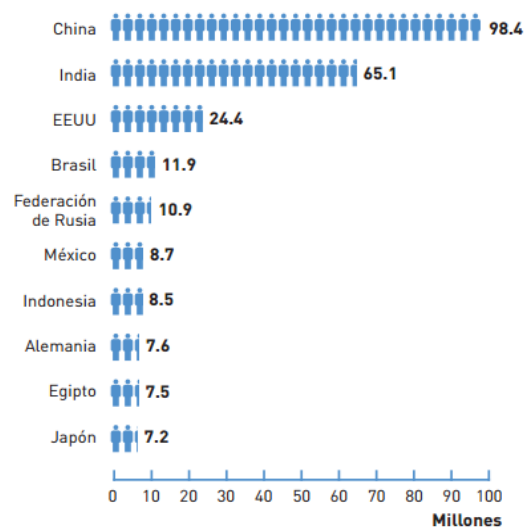


Figura 2.1: Principales países con mayor número de personas diabéticas en el mundo (Federation, 2012).

2.2 Hipótesis

La hipótesis en la que se basa este trabajo es la siguiente: Es posible determinar la línea basal de metabolitos presentes en el aliento de la población sana. Aquí, el concepto de línea basal se usa como el conjunto de metabolitos, sus valores y correlaciones que proporcionan una referencia que permite contrastar y estudiar diversas patologías, en base a un conjunto de compuestos orgánicos de referencia (C. Wang, P. Sahay, 2009). Para determinar este conjunto de compuestos y, por ende, la línea basal, se requiere la identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) presentes en el aliento exhalado por seres humanos. Asimismo, se requiere identificar y cuantificar, también, las correlaciones que existan entre la concentración de metabolitos presentes en el aliento y algunos parámetros fisiológicos y patológicos que indiquen salud o enfermedad, según sea el caso.

En particular la definición de la línea basal de la población sana, como se define líneas arriba, permitirá llevar a cabo estudios concernientes a detección temprana y monitoreo terapéutico de la población pre-diabética en estudios subsecuentes.

2.3 Justificación

El desarrollo de un sistema de análisis de metabolitos presentes en el aliento es una herramienta prometedora para el análisis de enfermedades en México. El estudio de compuestos orgánicos en el aliento y las relaciones de estos con diversas patologías como el cáncer, la diabetes, el asma entre otras, representa una posibilidad para el pre-diagnóstico y monitoreo no invasivo de muchas patologías. La disponibilidad en el futuro de una técnica no invasiva basada en el análisis de aliento exhalado brindaría múltiples beneficios en pro de la calidad de vida de los pacientes y la economía nacional de México.

En este trabajo se hace énfasis en el estudio de metabolitos presentes en el aliento y que estén asociados, desde el punto de vista estadístico y de correlaciones, a la patología diabética. La importancia de este método para la detección temprana y monitoreo terapéutico, radica en la problemática que genera esta enfermedad para México, siendo esta una de las principales causas de muerte en México (Federation, 2012), y que en los últimos años se ha comenzado a manifestar a edades cada vez más tempranas (ENSANUT, 2012).

2.4 Objetivo General

Desarrollar e implementar una técnica no invasiva para el análisis de metabolitos presentes en el aliento. El análisis de los metabolitos permitirá sentar bases para el estudio de múltiples patologías.

Determinar la línea basal de compuestos presentes en el aliento de las personas sanas como referente para estudios patológicos. La definición de la línea basal con sus respectivas incertidumbres es fundamental para el análisis de biomarcadores de enfermedades. La línea basal permitirá observar y contrastar diferencias entre pacientes sanos y enfermos. El objetivo particular de este trabajo se centra en estudiar los compuestos presentes en aliento de personas sanas y diabéticas. El objeto de esto es el de encontrar biomarcadores que puedan ser analizados y explorados con mayor detalle en el futuro para el oportuno diagnóstico de la pre-diabetes.

2.5 Objetivos Específicos

1. Estandarizar un protocolo de toma de muestras de aliento alveolar, mediante rutinas establecidas tanto para pacientes, como para el personal encargado de coleccionar la muestra.
2. Desarrollar un sistema portátil de toma de muestras de aliento alveolar, y pre-concentrar los compuestos orgánicos obtenidos de las muestras en cartuchos especiales.
3. Realizar la identificación y cuantificación indirecta de metabolitos presentes en el aire alveolar de pacientes metabólicamente sanos y diabéticos, mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-SM).
4. Hacer un análisis estadístico que permita determinar la línea basal de los metabolitos presentes en el aliento exhalado para una población normal. Determinar la dispersión estadística de estos compuestos de tal manera que permitan establecer los rangos de confiabilidad de las mediciones futuras.
5. Realizar el análisis de componentes principales de los compuestos en el aliento, e identificar los metabolitos asociados a la diabetes pro medio de correlaciones estadísticas.

CAPITULO 3: ANTECEDENTES

El diagnóstico médico de enfermedades mediante el análisis de metabolitos presentes en el aliento y la orina se remonta a la época griega (Hipócrates 460 A.C.). Desde esa época los médicos se apoyaban para el diagnóstico de diversas patologías analizando el olor del aliento exhalado y de los vapores de orina de los pacientes, así como también en la observación del color y textura de esta última.

El análisis del aliento moderno y sistemático comienza con el estudio realizado por el premio nobel en química, Linus Carl Pauling (1901-1994). En su artículo "*Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid partition Chromatography*" (L. Pauling, 1971), muestra cientos de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) producto del metabolismo corporal. En particular, reporta alrededor de 250 sustancias presentes en el aliento humano, y alrededor de 280 sustancias presentes en el vapor de orina, en niveles de partes por billón (ppb) o menores.

En las secciones siguientes se presentan los conceptos fundamentales que servirán de apoyo para entender el resto de la presente tesis. Estos conceptos son: El metabolismo humano, la mecánica respiratoria y la relación sincrónica entre estos que hacen posible que existan miles de compuestos químicos en el aliento, y de los cuales algunos son asociados a diversas patologías.

3.1 Metabolismo y Respiración

Para poder comprender por qué existen compuestos orgánicos en el aliento de las personas, es vital entender la dinámica compleja que existe en los distintos procesos fisiológicos involucrados. Asimismo, se requiere conocer las rutas de evacuación de los metabolitos que ya no son requeridos por el cuerpo, y la intervención del aparato respiratorio como una de las vías de eliminación de metabolitos o compuestos orgánicos mediante el aliento exhalado.

3.1.1 Metabolismo del Cuerpo Humano

El metabolismo es una actividad química altamente ordenada cuyo objetivo es la correcta manipulación de la materia y la energía por parte de la célula para así mantener el estado vital (Porto, 2010). El metabolismo se divide en dos grandes procesos: El catabolismo y el anabolismo. El catabolismo es una fase degradativa y el anabolismo es una fase constructiva o de biosíntesis.

En el proceso catabólico los nutrientes tales como carbohidratos, lípidos y proteínas provenientes del medio ambiente pueden ser degradados a moléculas sencillas como ácido láctico, el CO₂ y la urea. Este proceso se caracteriza por la liberación de energía inherente de los nutrientes. Parte de estos nutrientes se transforma en ATP. En el anabolismo, las moléculas precursoras se unen para formar componentes moleculares de la célula como polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Puesto que el anabolismo aumenta la complejidad de las estructuras biológicas requiere energía libre para llevarse a cabo. Esta energía es proporcionada por la hidrólisis del ATP (A. Garrido, R. Olmo, C. Castel, C. Teijón, 2001). Las funciones del metabolismo son:

1. La obtención de Energía química (ATP) por medio de la degradación de nutrientes ricos en energía (Figura 3.1).
2. Transformar moléculas nutrientes en moléculas útiles para la fabricación de componentes celulares.
3. Polimerizar precursores monoméricos a proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.
4. Sintetizar y degradar biomoléculas requeridas en funciones celulares especializadas (hormonas, neurotransmisores, etc.). (Delgado, 2012)

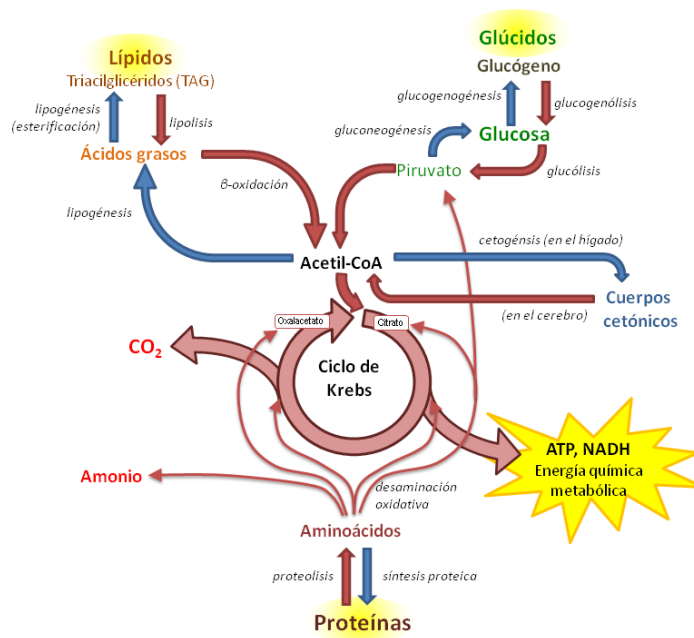


Figura 3.1: Esquema General del metabolismo: anabolismo ó síntesis en azul y catabolismo ó degradación en rojo. (McManus, 2013).

En teoría, cualquier biomolécula de cierta complejidad puede producir energía al ser degradada (fragmentada). Dicho esto, no todas estas moléculas son adecuadas para obtener energía química. Por ejemplo, algunas biomoléculas como el colágeno, la actina entre otras, son destinadas para funciones estructurales ó específicas en nuestro organismo.

Las reacciones que constituyen el metabolismo están localizadas en determinadas estructuras celulares llamadas orgánelos (figura 3.2), estas reacciones se llevan a cabo en los lugares en donde se encuentran las enzimas catalizadoras:

- Núcleo: se da el proceso de replicación del ADN, la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) mensajero y de transferencia.
- Nucléolo: se lleva a cabo la síntesis del ARN ribosomal (ARNr).
- Retículo endoplasmático: se lleva a cabo la síntesis de lípidos y el transporte intracelular.
- Ribosomas: se realiza la síntesis de proteínas
- Aparato de Golgi: se realiza la maduración de las glicoproteínas

- Mitocondrias: se lleva a cabo el catabolismo de los aminoácidos, el ciclo de Krebs, la oxidación del piruvato y los ácidos grasos (David L. Nelson, 2009.)

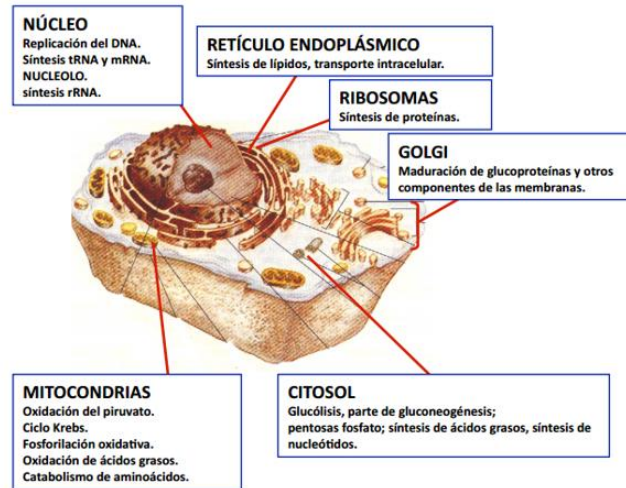


Figura 3.2: Rutas metabólicas dentro de la célula (David L. Nelson, 2009.)

Una vez que una sustancia ha sido absorbida, los productos secundarios del metabolismo que no son necesarios para el cuerpo son excretados con rapidez, la eliminación se produce fundamentalmente mediante los procesos listados a continuación (López, 2012):

1. **Excreción renal:** los riñones están principalmente y perfectamente designados para la excreción. Estos órganos participan en la eliminación de muchos productos del metabolismo normal. Los riñones humanos contienen aproximadamente 2.400.000 nefronas, siendo esta la unidad funcional del riñón en las que se lleva a cabo procesos importantes en la formación de la orina.
2. **Excreción Hepática y por heces:** La bilis contribuye a la excreción de los metabolitos formados en el hígado. El hígado tiene una situación ideal para su papel en el metabolismo de nutrientes. Los productos del metabolismo hepático pueden ser liberados a la sangre circulante (mediante la excreción renal) o excretados en la bilis.

Las sustancias con peso molecular mayor a 350 se excretan más fácilmente vía biliar, una vez formada la bilis pasa al intestino para ser excretada con

las heces, dado esto se sabe que el hígado secreta de 0,25 a 1 litro de bilis al día.

3. **Excreción mediante el aire exhalado (Pulmones):** Cualquier compuesto en sangre suficientemente volátil pasará a través de la membrana alveolar a los pulmones (difusión pasiva) y será exhalado. El grado de excreción dependerá de la solubilidad en sangre, volumen de respiración y el flujo de sangre a los pulmones. La baja solubilidad en sangre permite una excreción rápida y está limitada por la perfusión (flujo de sangre), mientras que para los compuestos con una alta solubilidad en sangre su excreción está limitada por la ventilación. Entre los compuestos que salen principalmente por exhalación se encuentran gases anestésicos (éter), pesticidas fumigantes, algunos solventes orgánicos volátiles, y metabolitos volátiles de algunos xenobióticos no volátiles.

3.1.2 Mecánica respiratoria

El aparato respiratorio es un conjunto complejo de funciones que tienen como propósito principal el intercambio de gases entre la atmósfera y la sangre. Por medio de este intercambio gaseoso se suministran cantidades adecuadas de oxígeno a billones de células del organismo y se elimina el CO₂ producto del metabolismo en el cuerpo humano. Otras funciones secundarias son la regulación homeostática del pH corporal ya sea reteniendo o eliminando CO₂, la protección frente a patógenos inhalados y la vocalización a través de las cuerdas vocales (Silverthorn, 2008).

El aparato respiratorio se divide en dos partes (figura 3.3). La vía aérea superior compuesta por la boca, cavidad nasal, faringe y laringe y la vía aérea inferior ó porción torácica que está compuesta por tráquea, dos bronquios principales, sus ramificaciones y los pulmones.

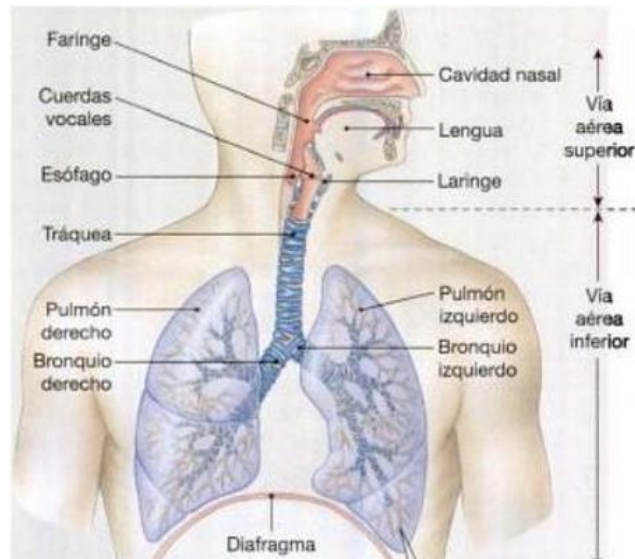


Figura 3.3: El aparato respiratorio: vías aéreas superior e inferior. (Silverthorn, 2008).

El aire presente en la atmósfera ingresa a la vía aérea superior a través de la boca y nariz y luego se dirige a la faringe. El aire pasa de la faringe a la laringe, lugar donde se encuentran las cuerdas vocales. Posteriormente el aire es dirigido a la tráquea, la cual se ramifica en dos bronquios principales, un bronquio para cada pulmón. Dentro de los pulmones los bronquios se ramifican repetidamente hasta alcanzar 11 divisiones. Cuando los bronquios alcanzan un tamaño muy pequeño y no tienen cartílago reciben el nombre de bronquiolos, los cuales continúan subdividiéndose hasta 23 divisiones (figura 3.4a). En nuestros pulmones tenemos aproximadamente 750.000.000.

De los bronquiolos respiratorios se desprenden los conductos alveolares que a su vez terminan en sacos alveolares y constituyen la mayor parte del tejido pulmonar. La función principal de éstos es el intercambio gaseoso entre ellos mismos y la sangre. De esta forma se realiza el proceso en el alveolo de eliminación del CO_2 y obtención de O_2 , proceso denominado respiración celular.

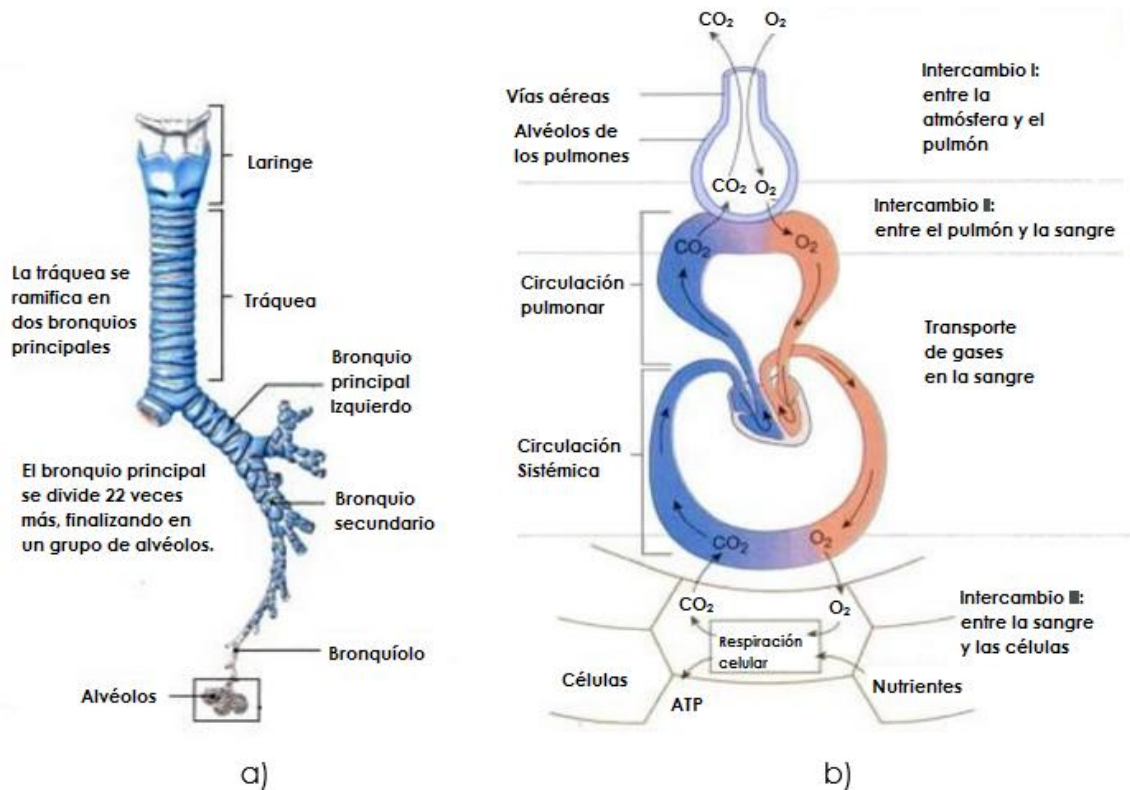


Figura 3.4: Intercambio gaseoso: a) ramificación de las vías aéreas, b) Intercambio gaseoso en las vías aéreas (Silverthorn, 2008).

La respiración celular es la interacción intracelular del oxígeno con las moléculas orgánicas para producir dióxido de carbono, agua y energía bajo la forma de ATP. La respiración externa es el movimiento de gases entre el ambiente y las células del organismo. La respiración externa puede dividirse en cuatro procesos (figura 3.4b)

1. Intercambio de aire entre la atmósfera y los pulmones, este proceso se lleva a cabo mediante la inhalación y exhalación de aliento.
2. Intercambio de O_2 y CO_2 entre los pulmones y la sangre.
3. Transporte de O_2 y CO_2 por la sangre.
4. Intercambio de nutrientes y gases entre la sangre y las células.

Espacio Muerto y Volúmenes Pulmonares

El espacio muerto ó volumen muerto es la porción de volumen que no toma parte del intercambio gaseoso en los alveolos. El espacio muerto se divide en dos partes: Los espacios muertos anatómico y fisiológico, respectivamente. El espacio muerto anatómico (EMA) es el volumen total de las vías aéreas de conducción

desde la nariz y boca hasta el nivel de los bronquiolos terminales. El EMA constituye un volumen de 150 mL promedio en los humanos, aunque puede variar de 100 a 200 mL por persona. El espacio muerto fisiológico (EMF), por otra parte, incluye todas las partes no-respiratorias del árbol bronquial incluyendo el espacio muerto anatómico, además de aquellas regiones que por diferentes factores están bien ventilados pero mal perfundidos y por lo tanto son menos eficientes en el intercambio de gases con la sangre (Hopkins, 1995).

Los volúmenes pulmonares varían significativamente con la edad, el sexo y la altura (Tabla 3.1). Dicho lo anterior, el volumen pulmonar en las mujeres puede ser de 20-25% menor al volumen pulmonar de un hombre de 70 kg (Silverthorn, 2008). El aire que se moviliza durante un proceso respiratorio se puede dividir en cuatro sub-volúmenes, que se listan a continuación:

- ✓ El volumen corriente **V_c**: Es el volumen de aire que se desplaza durante una inspiración o espiración común, el volumen corriente promedio durante una inspiración tranquila es de 500 mL.
- ✓ El volumen inspiratorio de reserva **VRI**: Lo constituye el volumen de aire que se inspira adicionalmente al volumen corriente en una inspiración forzada. El volumen inspiratorio de reserva en un hombre promedio de 70 kg es de 3000 mL.
- ✓ El volumen espiratorio de reserva **VRE**: Es el volumen de aire que se exhala forzadamente luego de una exhalación normal, en promedio el volumen espiratorio de reserva es de 1100 mL.
- ✓ El volumen residual **VR**: Es el volumen presente en el aparato respiratorio después de una exhalación máxima. Este volumen residual se debe a que los pulmones se mantienen estirados contra la pared torácica por el líquido pleural. No es posible medirse directamente ya que siempre permanecerá aire en los pulmones y vías aéreas. El volumen residual es aproximadamente de 1200 mL.

Capacidad pulmonar

La capacidad pulmonar es la suma de dos o más volúmenes pulmonares, de esta forma se definen la Capacidad Vital como la suma del volumen corriente, el volumen inspiratorio de reserva y el volumen espiratorio de reserva. La capacidad vital representa la cantidad máxima de aire que puede movilizarse voluntariamente en una respiración.

VOLÚMENES PULMONARES				
	VRI	VC	VRE	CAPACIDAD VITAL
MUJERES	1900	500	700	3100
HOMBRES	3000	500	1100	4600

Tabla 3.1: Volúmenes pulmonares en hombres y mujeres (Silverthorn, 2008).

3.2 Metabolitos en el aliento y patologías identificables.

Un metabolito es una molécula utilizada ó elaborada por el cuerpo cuando se procesa internamente los alimentos, medicamentos, sustancias químicas. Incluso el procesamiento del propio tejido (por ejemplo, la grasa o el tejido muscular), en un proceso metabólico. Como se describió previamente, una de las rutas de evacuación de los metabolitos es mediante el aliento exhalado. Por tanto, la evaluación del aliento exhalado presenta valiosa información de la homeóstasis corporal y los procesos internos.

3.2.1 Compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en el aliento

En el capítulo 3.1.1 del presente texto, se mencionó que una de las formas de eliminar los metabolitos del cuerpo humano es mediante el aliento exhalado. Este hecho se ha prestado para múltiples estudios, razón por la cual múltiples metabolitos han recibido el nombre de biomarcador por su relación con alguna ó múltiples patologías.

El análisis del aliento se puede clasificar en dos grupos (C. Wang, P. Sahay, 2009): El análisis de los metabolitos de aliento después de la administración de un fármaco por una parte y el análisis de compuestos de aliento producidos de forma

endógena debido a un estado fisiológico particular, por la otra. Hoy en día se conoce muy bien la composición del aliento humano normal. Este contiene unas pocas moléculas atmosféricas, por ejemplo, H_2O , CO_2 , N_2 , O_2 , en concentraciones relativamente altas. Asimismo, también hay presencia en el aliento de varios compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en bajas concentraciones, por ejemplo, acetona, isopreno, propanoles, alcoholes entre varios otros.

Hoy en día se han detectado más de 3.000 compuestos diferentes en el aliento (Phillips M, 1999). Se sabe que diversos factores pueden influir en la composición del aliento humano, como la condición física, la existencia de diversas patologías, el estado de salud general, la ingesta de alimentos y medicamentos, los factores ambientales y determinados estilos de vida. La Asociación Internacional para la Investigación de la respiración (IABR), posee una base de datos en constante actualización de las sustancias volátiles de origen humano y animal descubiertas en los diferentes centros de análisis en el mundo.

El artículo *"Breath Analysis Using Laser Spectroscopic Techniques: Breath Biomarkers, Spectral Fingerprints, and Detection Limits"* (C. Wang, P. Sahay, 2009), muestra un panorama general de los compuestos volátiles que se han establecido como biomarcadores para enfermedades específicas o trastornos metabólicos (ver tabla 3.2). Por ejemplo, los alcanos están presentes en el caso de cáncer de pulmón, el formaldehído en el caso de cáncer de mama; el isopreno está relacionado con los niveles de colesterol en la sangre. Los pacientes con diabetes tipo 1 tienen un exceso de cuerpos cetónicos en el aliento.

BIOMARCADORES IDENTIFICADOS DEL ALIENTO Y SUS SÍNTOMAS FISIOLÓGICOS	
BIOMARCADOR	ENFERMEDAD O TRASTORNO METABOLICO ASOCIADO
Acetona ($\text{OC}(\text{CH}_3)_2$)	Cáncer de pulmón, la diabetes, la pérdida de grasa con dieta, la insuficiencia cardiaca congestiva, convulsiones cerebrales
Acetaldehído (CH_3CHO)	Alcoholismo, las enfermedades relacionadas con el hígado, el cáncer de pulmón
Amoníaco (NH_3)	Enfermedades renales, asma
Butano (C_4H_{10})	Marcadores tumorales en el cáncer de pulmón

Monóxido de carbono (CO)	El estrés oxidativo, las infecciones respiratorias, las anemias
Disulfuro de carbono (CS ₂)	Enfermedades Esquizofrenia, coronarias y arteriales
Dióxido de carbono (CO ₂) (13C-Isótopos)	El estrés oxidativo
Sulfuro de carbonilo (OCS)	Las enfermedades del hígado relacionadas
Etano (C ₂ H ₆)	La deficiencia de vitamina E en los niños, la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	La producción de bacterias intestinales
Etileno (C ₂ H ₄)	La peroxidación lipídica, daño de la radiación ultravioleta de la piel
Hidrógeno (H ₂)	Indigestión en bebés, malestar intestinal, fermentación colónica
H / D isótopo	El agua corporal
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	asma
Cianuro de hidrógeno (HCN)	Pseudomonas aeruginosa en los niños afectados con fibrosis quística
8-isoprostanos	Estrés oxidativo
Isopreno	Colesterol sanguíneo
El metano (CH ₄)	Problemas intestinales, la fermentación colónica
Metanotiol (CH ₃ SH)	Halitosis
Metanol (CH ₃ OH)	Trastornos del sistema nervioso
Aminas metiladas	Metabolismo de las proteínas en el cuerpo
Nitrato de metilo (CH ₃ NO ₃)	Hiperglucemia en la diabetes tipo 1
Monóxido de nitrógeno (NO)	Asma, las bronquiectasias, la hipertensión, la rinitis, enfermedades pulmonares
Nitrotirosina (C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₅)	Asma
Oxígeno (O ₂)	Respiración
Pentano (C ₅ H ₁₂)	Peroxidación de los lípidos, enfermedades hepáticas, la esquizofrenia, el cáncer de mama, la artritis reumatoide
Piridina (C ₅ H ₅ N)	Enfermedad periodontal
Compuestos de azufre	Mal olor hepático, el cáncer de pulmón
Hidrocarburos (tolueno (C ₆ H ₅ CH ₃), benceno (C ₆ H ₆), heptano (C ₇ H ₁₆), decano (C ₁₀ H ₂₂), estireno (C ₈ H ₈), octano (C ₈ H ₁₈), pentametilheptano (C ₁₂ H ₂₆))	Peroxidación lipídica, el cáncer de pulmón, el estrés oxidativo, la inflamación de las vías respiratorias

Tabla 3.2: Compuestos orgánicos presentes en el aliento humano y relación con diversas patologías (C. Wang, P. Sahay, 2009).

Clasificación De Los Compuestos Orgánicos en el aliento

Los compuestos orgánicos presentes en el aliento pueden ser clasificados en tres grupos de acuerdo a su origen (J. López, 2014).

1. **Compuestos Orgánicos de origen sistémico ó endógeno:** Estos compuestos son los que circulan en la sangre y tienen la capacidad de ser eliminados en el organismo a través de los alvéolos pulmonares ó mediante las glándulas salivales. Los compuestos orgánicos presentes en el aliento y de origen sistémico pueden ser volátiles (VOC's) o no serlo. Los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) pueden ser orgánicos o inorgánicos. Los orgánicos generalmente son hidrocarbonatos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, alcanos, entre otros. Los inorgánicos por ejemplo: óxido nítrico, oxígeno molecular, dióxido de carbono, etc. También hay presente compuestos no volátiles en el aire expirado, por ejemplo: isoprostanos, citosinas, leucotrienos, peróxido de hidrógeno, etc.
2. **Compuestos Orgánicos volátiles de origen extrasistémico ó exógeno:** en este grupo se encuentran los compuestos orgánicos presentes en el aparato respiratorio superior. Por ejemplo las células o tejidos de la boca, la nariz, laringe, los senos paranasales, y el tracto gastrointestinal que también contribuirán a moléculas (tabla 3.3) de aire exhalado o faringe y no están presentes en la sangre circulante (RISBY, 2005). Muchos de estos compuestos son provenientes del ambiente que respiramos ó de la actividad bacteriana bucal.
3. **Compuestos Sulfurados Volátiles (CSVs):** los compuestos sulfurados volátiles (CSVs) son aquellos que contienen azufre en su composición. Son generalmente descritos como un grupo aparte debido a su prevalencia y relevancia. Se encuentran principalmente en los casos de halitosis, pudiendo tener origen sistémico o extrasistémico. Los CSVs más frecuentes son el sulfuro de hidrógeno (H_2S), el metilmercaptano (CH_3SH) y el dimetilsulfuro ($(CH_3)_2S$). El análisis de muestras de aliento por cromatografía de gases ha demostrado que los dos primeros son los CSVs responsables del 90% del olor de la boca.

CONCENTRACIONES TÍPICAS DE MOLECULAS ENDÓGENAS EN EL ALIENTO	
Concentración (v/v)	Molécula
Porcentaje (%)	Oxígeno, agua, dióxido de carbono
Partes por millón (ppm)	Acetona, monóxido de carbono, metano, hidrógeno
Partes por billón (ppb)	Formaldehído, acetaldehído, isopreno, n-pentano, etano, etanol, etileno, otros hidrocarburos, óxido nítrico, disulfuro de carbono, metanol, metanotiol, amonio, dimetil sulfuro etc.

Tabla 3.3: Concentraciones típicas de moléculas endógenas ó sistémicas en el aliento humano (RISBY, 2005).

Hoy en día sólo seis pruebas de aliento son comúnmente realizadas en el ámbito clínico. El uso de estas pruebas se centra, fundamentalmente, en el diagnóstico y seguimiento clínico de las enfermedades pulmonares, especialmente asma. Asimismo, estos estudios se emplean en el seguimiento y análisis de la fisiología en pacientes sanos (Tabla 3.4). No obstante, las anteriores son las aplicaciones más comunes, pero otra técnica comúnmente utilizada son las pruebas de aliento con el uso de alcoholímetros con el fin de que cumplan las leyes.

PRUEBAS CLINICAS DE ALIENTO MAS DESARROLLADAS	
Dióxido de Carbono	Prueba de capnografía
Monóxido de carbono	Ictericia neonatal
Pruebas de aliento	Detectar el rechazo de trasplante de corazón
Hidrógeno	Deficiencia de disacáridos, tiempo de tránsito gastrointestinal, sobre crecimiento bacteriano, Estado intestinal.
Óxido Nítrico	Terapia de asma
Urea, ¹³ C	Detección infección por H.pylori
Etanol	Cumplimiento de las leyes

Tabla 3.4: Principales compuestos más estudiados y desarrollados en pruebas clínicas de aliento

3.2.2 Patología diabética

La diabetes Mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por la presencia de hiperglicemia (PUC, 2008). Esto es debido a que la secreción de insulina del páncreas es mínima o poca, o bien la producida no es utilizada adecuadamente (también llamada resistencia a la insulina). La

hiperglicemia a largo plazo puede generar en las personas disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, y vasos sanguíneos; la diabetes también puede causar enfermedades cardíacas, derrames cerebrales e incluso la necesidad de amputar algún miembro.

La Asociación Americana de Diabetes, propone una clasificación y criterios diagnósticos de la Diabetes Mellitus (ADA, 1997), se incluyen 4 categorías de pacientes y un 5º grupo de individuos que tienen glicemias anormales con alto riesgo de desarrollar diabetes (también tienen mayor riesgo cardiovascular):

1. Diabetes Mellitus tipo 1: Se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas, los pacientes presentan una deficiencia absoluta de insulina no proporcionada por el páncreas, además estos pacientes tienen gran tendencia a la cetoacidosis (degradación de lípidos para obtener ATP) y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes)

2. Diabetes Mellitus tipo 2: los pacientes presentan una especie de insulino-resistencia, el páncreas segrega insulina, quizá poca y esta puede no ingresar en la célula. Los pacientes son en mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica)

3. Otros tipos específicos de Diabetes: los pacientes pueden padecer alguna de las siguientes patologías

- Defectos genéticos en la función de las células beta del páncreas
- Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- Patologías pancreáticas ó endocrinopatías
- Algunos fármacos, infecciones, y síndromes pueden producir diabetes secundaria.

4. Diabetes Gestacional: Aparecen en la madre en el curso del embarazo, está asociada a mayor riesgo en el embarazo y parto. La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa.

5. Intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada: los pacientes con Intolerancia a la glucosa presentan una respuesta anormal a la sobrecarga de glucosa suministrada por vía oral. En estos pacientes se espera que el páncreas pueda liberar suficiente insulina como para disminuir los niveles de azúcar. La glicemia de ayuno alterada se caracteriza por el hallazgo de una glicemia de ayuno entre 100 y 125 mg/dl, y su identificación sugiere el realizar una prueba de sobrecarga de glucosa oral, para la clasificación definitiva.

Anatomía y fisiología Pancreática

El páncreas es un órgano complejo alargado, mide de 12 a 15 cm de largo y puede pesar hasta 100 gramos. Su color es gris-amarillento, o rosado si está en actividad. Está localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen, detrás del estómago (Huelva, 2009). Anatómicamente el páncreas puede dividirse en tres segmentos: cabeza, cuerpo y cola.

El páncreas es una glándula mixta de secreción endócrina y exócrina. Las células exocrinas del páncreas secreta jugo pancreático, siendo este rico en enzimas, sodio, potasio, cloro y bicarbonato de sodio. Esta mezcla constituye una sustancia alcalina que proporciona un ambiente químico, el PH básico, para regular el quimo-ácido que está pasando por el duodeno y bajar el PH (Espinosa, 2014). Muchas células endocrinas del páncreas producen enzimas digestivas que fluyen por el conducto pancreático y se vierten en el intestino delgado para digerir los alimentos. El páncreas contiene islotes de células que producen tres hormonas muy importantes: El glucagón, la insulina, y la somatostatina. Las dos primeras son encargadas de regulación del azúcar (glucosa) en la sangre y la somatostatina se encarga de inhibir la secreción de insulina y glucagón.

- **Células alfa** (también denominadas células A), que segregan la hormona **glucagón**. El glucagón tiende a incrementar los niveles de glucogénesis, estimulando la conversión de glucógeno en glucosa en las células hepáticas (figura 3.5), estimulando la captación de aminoácidos por el hígado para incrementar la producción de glucosa.

- **Células beta** (células B), que segregan la hormona **insulina**. La insulina tiende a favorecer el movimiento de glucosa (figura 3.5), aminoácidos y ácidos grasos de la sangre a los tejidos.
- **Célula delta** (células D), que segregan la hormona **somatostatina**. La somatostatina afecta a diferentes tejidos del cuerpo, pero su principal papel parece ser regular las otras células endocrinas de los islotes pancreáticos. Ésta inhibe la secreción de glucagón, insulina y polipéptido pancreático, así como la secreción de la hormona del crecimiento por la hipófisis anterior.
- **Células polipéptidas pancreáticas** (células F o PP), que segregan polipéptido pancreático, el cual influye en algún grado en la digestión y en la distribución de las moléculas alimentarias

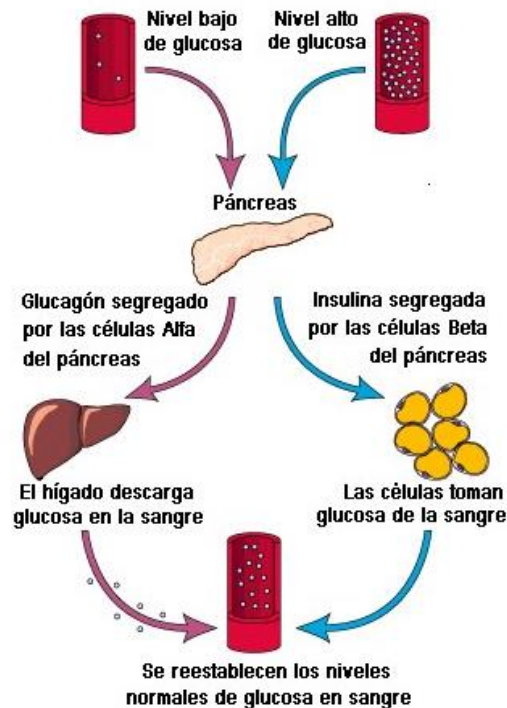


Figura 3.5: Regulación de glucemia mediante la emisión de insulina y glucagón (Huelva, 2009).

3.2.3 Antecedentes del análisis del aliento en la detección de la diabetes

Hoy en día múltiples estudios se han dedicado a encontrar relaciones significativas entre metabolitos presentes en el aliento y factores patológicos

propios de la diabetes. En el año 2010, Chuji Wang y colaboradores publican el artículo "A Study on Breath Acetone in Diabetic Patients Using a Cavity Ringdown Breath Analyzer: Exploring Correlations of Breath Acetone With Blood Glucose and Glyco hemoglobin A1C". En este estudio se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de acetona en el aliento de las personas con diabetes y algunos parámetros de diagnóstico como lo son la glucosa en sangre (BG) y la hemoglobina glicosilada (A1C) (C. Wang, A. Mbi & M. Shepherd, 2010). Chuji Wang emplea para sus medidas la técnica espectroscópica cavity ringdown (CRDS). Esta técnica es aplicada en 15 pacientes sanos, 34 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y 10 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los resultados del análisis estadístico muestra correlaciones lineales, cuando los pacientes son agrupados según la glucosa en sangre y la hemoglobina glicosilada; los resultados muestran que la concentración media de acetona en los pacientes con diabetes tipo 1 es 2,19 ppmv (partes por millón en volumen), siendo mayor que la concentración del aliento de acetona media de las personas sanas que corresponde a 0,48 ppmv.

Otras técnicas, como la cromatografía de gases acoplada a espectrómetros de masas también han sido implementadas para el análisis del aliento. Por ejemplo, Gong ZY y colaboradores en su artículo "A Ringdown Breath Acetone Analyzer: Performance and Validation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry" (Gong ZY et al. 2014), realiza un estudio sobre las capacidades, límites de detección y reproducibilidad de las técnicas cavity ringdown spectroscopy (CRDS) y gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Gong ZY también analiza en pacientes sanos y con diabetes parámetros de diagnóstico como lo son la glucosa en sangre (BG) y la hemoglobina glicosilada (A1C). Contempla, asimismo, la cantidad de años con diabetes, sexo, índice de masa corporal, peso, estatura de cada paciente y sus respectivas concentraciones en partes por millón de volumen (ppmv) durante el ayuno, después del desayuno, almuerzo y cena. Finalmente Gong ZY también encuentra que La concentración de acetona media en 19 sujetos sanos fue de 1.19 ppm, mientras que en los sujetos diabéticos fue de 2.68 ppmv.

El análisis del aliento de los pacientes con diabetes no se ha limitado solamente al análisis de acetona, Yanyue Yan presenta un estudio en el año 2014 titulado "Discovery of potential biomarkers in exhaled breath for diagnosis of type 2 diabetes mellitus based on GC-MS with metabolomics" (Yanyue Yan, 2014). En este estudio, y mediante cromatografía gases y espectrometría de masas (GC-MS) el autor logró identificar 8 firmas metabólicas distintas de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2):

- Acetona
- Isopropanol
- Tolueno
- m-Xileno
- 2,3,4-Trimetilhexano
- 2,6,8-Trimetildecano
- Undecano
- Tridecano

En este artículo Yanyue Yan concluye que estos ocho metabolitos específicos podrían ser los mejores biomarcadores para el diagnóstico clínico de la DM2, con una sensibilidad del 97,9% y una especificidad del 100%.

Aunque, se han dedicado múltiples estudios previos, como el referido anteriormente al análisis de metabolitos asociados a la diabetes, ninguno de estos se ha enfocado a la población mexicana. En este proyecto se busca establecer la línea de basal de compuestos en pacientes Mexicanos sanos, para determinar las variaciones respecto a estos biomarcadores al contrastarlos con los valores presentados por estos metabolitos en muestras de aliento de pacientes Mexicanos con diabetes. Este aspecto es de gran importancia, ya que un factor importante en la composición del aliento son los hábitos alimenticios, culturales y hasta genéticos de las poblaciones. Actualmente no se cuenta con una línea basal de referencia, ni una lista de potenciales biomarcadores para la población mexicana y el propósito de este estudio es proporcionarla.

CAPITULO 4: FUNDAMENTOS TEORICOS

Existen dos métodos para detectar y cuantificar los compuestos presentes en el aliento: Los métodos ópticos y no ópticos (J. Wojtas, 2012). En los últimos veinte años los métodos ópticos, en especial las técnicas láser se han vuelto más populares para la detección y seguimiento de los compuestos gaseosos. Como ejemplo de éstas técnicas podemos mencionar: Las espectroscopias: *tunable diode laser absorption spectroscopy* (TDLAS), *cavity ringdown spectroscopy* (CRDS), *integrated cavity output spectroscopy* (ICOS), "cavity enhanced absorption spectroscopy (CEAS), *photoacoustic spectroscopy* (PAS). Dado que estas técnicas fueron desarrolladas por laboratorios anglosajones, se respeta en este trabajo sus nombres originales, para mayor claridad.

No obstante las técnicas no ópticas también han tenido un aporte valioso en la detección y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el aliento. Por ejemplo la cromatografía de gases con espectrometría de masas, la espectrometría de movilidad iónica, la espectroscopía por transferencia de protones y por análisis de masas por tiempo de vuelo, entre otras. J. Wojtas y colaboradores presentan también en su trabajo las técnicas espectroscópicas más apropiadas para el análisis de diversos biomarcadores presentes en el aliento (J. Wojtas, 2012). Asimismo, estos autores reportan los límites de concentración (ppm, ppb ó ppt) propias de cada técnica espectroscópica para determinados biomarcadores.

4.1 Técnicas para el análisis del Aliento Humano.

Para el análisis del aliento humano se han aplicado diferentes técnicas. Estas se han llevado a cabo con el fin de detectar y medir con gran precisión los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) presentes en el aliento. La mayoría de las técnicas de medición se pueden clasificar en tres grandes grupos (K. Kim, 2012):

1. Técnicas basadas en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La cromatografía de Gases con Detector de Ionización

de llama (CG – FID) o bien otros métodos basados en espectrometría de masas.

2. Técnicas químicas.
3. Técnicas de espectroscopía láser.

La elección del método analítico para el análisis del aliento, debe basarse en el tipo de biomarcador que se quiere detectar y los límites de detección (LD) que conlleva la técnica. Por ejemplo, las técnicas de cromatografía de gases con espectrometría de masas solo pueden detectar y cuantificar biomarcadores de enlace C-H. Por lo anterior el biomarcador del amoníaco no podría analizarse bajo esta técnica. Asimismo, una técnica que muestre en el rango de ppmv, no podría detectar analitos en el aliento humano en concentraciones que están normalmente en pptv.

4.1.1 Técnicas basadas en cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un método de separación de compuestos de una muestra. La separación de los compuestos se distribuyen en dos fases: Una fase estacionaria y otra móvil. La fase móvil es encargada de percolar a través de la fase estacionaria. Las técnicas cromatográficas se dividen en dos grandes grupos según sea la fase móvil. Si esta es un gas la técnica es llamada cromatografía de gases, y si la fase móvil es un líquido la técnica es llamada cromatografía líquida.

En el proceso cromatográfico, se inyecta la muestra mediante una corriente de gas inerte en una fina columna a elevada temperatura (figura 4.1). Los componentes de la mezcla son arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario. Debido a las propiedades de los componentes de la mezcla y a repetidos procesos de sorción y desorción, se lleva a cabo separación de los compuestos en función de sus diferencias en las constantes de distribución.

Al finalizar el proceso de separación de los compuestos, estos emergen de la columna a intervalos discretos. Los compuestos son analizados con un detector (figura 4.1). Este detector puede ser tipo llama o espectrómetro de masas. La información obtenida de cada compuesto es visualizada en un cromatograma, el

cual muestra los picos correspondientes a cada compuesto en función del tiempo de retención y su abundancia en la muestra. El tiempo de retención (t_R), es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra y la detección de un compuesto, el t_R de cada componente es propio de cada compuesto presente en la muestra.

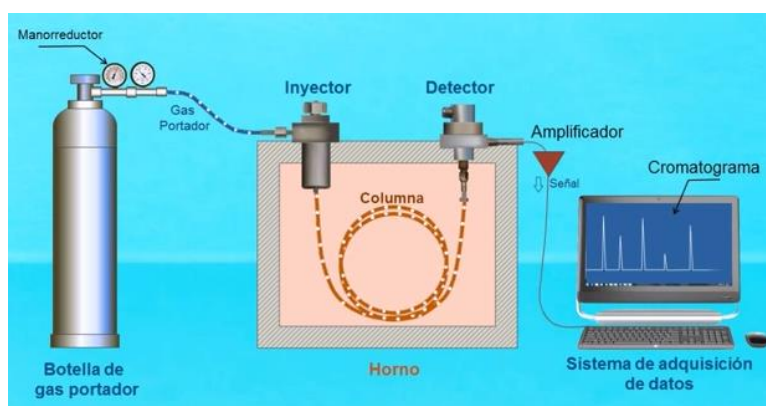


Figura 4. 1: Esquema de Cromatografía de gases. Fuente: Instituto de química general, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.

Fase estacionaria

La fase estacionaria tiene como función separar los componentes de la mezcla, esta puede ser líquida o sólida y dispuesta sobre la columna cromatográfica. En la fase sólida la interacción con la fase móvil puede ser de tres tipos: Adsorción, Intercambio iónico y filtración sobre geles porosos. La fase sólida puede ser de carbono, aluminio, sílica gel, entre otros. En la fase líquida la interacción con la fase móvil es de reparto, y suele utilizarse en cromatografía de gases, la fase líquida debe tener una baja viscosidad una alta y diferencial solubilidad (L. Olguín, 2004).

El orden de elución de los compuestos (figura 4.2), dependerá de la ebullición de los solutos y de su solubilidad. Así, cuando se cuenta con compuestos homólogos, el orden de elución es el mismo que el orden de ebullición independiente de la fase empleada. Una buena resolución en el cromatograma, requiere que la fase estacionaria cuente con una retención relativa (ó cociente de tiempos de retención) mayor a la unidad.

ORDEN DE ELUSIÓN DE COMPUESTOS EN EL CROMATÓGRAFO.

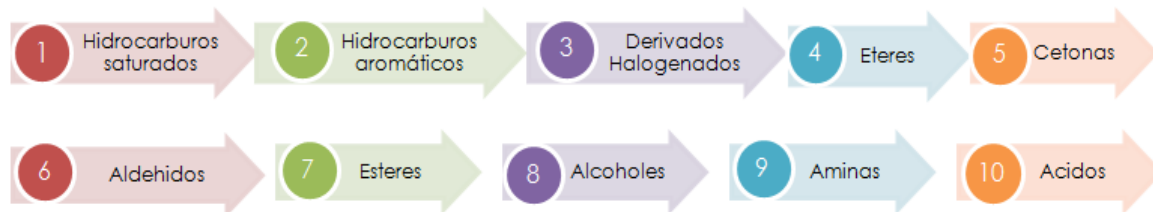


Figura 4. 2: Orden de elusión de los compuestos en el cromatógrafo.

Una desventaja de la cromatografía de gases es que esta se encuentra restringida a la separación de compuestos con peso molecular inferior a 1000 y a una temperatura máxima de operación de 400°C (CSIC, 2011). No obstante la presencia de humedad en la muestra también representa un problema para el análisis, pudiendo afectar el cromatógrafo. Existen diversos factores importantes en cromatografía, algunos de estos se anuncian a continuación realizándose una breve descripción de éstos.

Coeficiente de distribución (K)

Al introducir la muestra de análisis en el sistema cromatográfico, los compuestos se distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria. El coeficiente de distribución determina la velocidad promedio de cada zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en fase está dada por el coeficiente termodinámico de reparto ó de distribución (Yagües, 2008):

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Ecuación 4. 1: Coeficiente termodinámico de reparto K.

En la ecuación 4.1 C_S , y C_M son las concentraciones molares del soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. Si el coeficiente de distribución es grandes representa una buena separación entre distintos componentes.

Factor de capacidad ó factor de retención (K')

El factor de capacidad representa la retención de un compuesto debido a la fase estacionaria. El factor de capacidad es independiente del caudal de la fase móvil, y una magnitud adimensional (CSIC, 2011).

$$K' = \frac{T_R - T_M}{T_M}$$

Ecuación 4. 2: Factor de Capacidad K'.

En la ecuación 4.2 T_R es el tiempo de retención del compuesto, y T_M es el tiempo muerto, o tiempo necesario para que un compuesto no retenido (o la fase móvil) llegue al detector (UJAEN, 2006). En la práctica los compuestos de interés deben presentar valores en su factor de capacidad entre 1 y 15, esto con el fin de no alargar los tiempos de separación de los compuestos.

La técnica comúnmente utilizada para el análisis del aliento es la cromatografía gaseosa. No obstante aproximadamente el 95% del aliento es vapor de agua. Las moléculas de agua al pasar por estados de altas y bajas temperaturas se pueden cristalizar, y en su paso por la fina columna cromatográfica pueden generar una ruptura en esta. Para la eliminación de la humedad del aliento se han dispuestos múltiples métodos, que van desde la implementación de tubos de nafión (figura 4.3a), hasta la preconcentración de los compuestos orgánicos en cartuchos absorbentes (figura 4.3b).

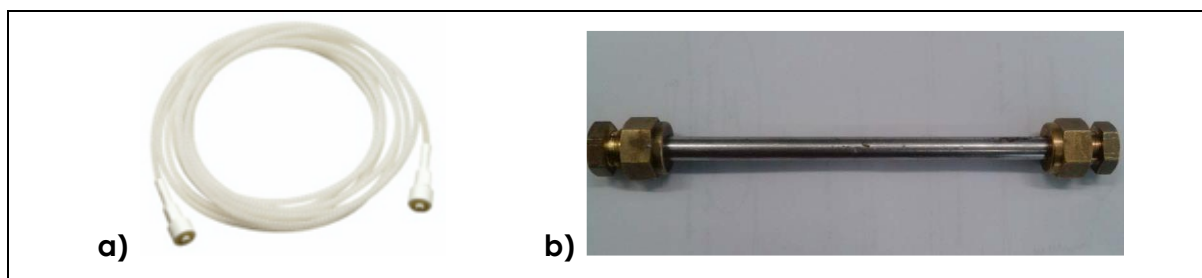


Figura 4. 3: Métodos para la eliminación de vapor. a) tubo de Nafión. b) Purga en seco con tubos absorbentes.

El nafión es un polímero de tetrafluoroetileno (Teflón) y ácido 3,6- perfluoro-4-dioxa-7-metil-octeno-sulfónico. La tecnología clave de los tubos de nafión es que son altamente selectivos en la extracción de agua. El agua se mueve a través de

la pared de la membrana y se evapora en el aire circundante en un proceso llamado pervaporación.

Los cartuchos adsorbentes de compuestos orgánicos contienen en sus interiores materiales especiales como el Tenax, Chromosorbs, Porapak, Carbotraps. Estos adsorbedores tienen una afinidad especial para atrapar determinadas cadenas carbonadas, por ejemplo el Carbotrap X atrapa compuestos 3 a 9 carbonos en su composición, el Carbotrap B atrapa compuestos de 5 a 12 carbonos en su composición. Aun en un medio ambiente con una humedad alta (> 90 % H.R.), este método permite separar la humedad (TO-17, 1999), y retener cuantitativamente una amplia variedad de compuestos orgánicos volátiles (alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, éteres y glicoles).

4.1.2 Técnicas químicas.

Existen múltiples técnicas de análisis de compuestos gaseosos orgánicos e inorgánicos basadas en sensores químicos. Actualmente la mayoría de estos sensores se basan en la alteración en la resistencia eléctrica con la concentración de moléculas gaseosas. En particular la implementación de superficies semiconductoras (TiO_2 , SnO_2 , ZnO), y polímeros conductores dopados con material catalítico (Pd, Cu, Ni, Pt) han sido fuente de múltiples estudios enfocados al análisis de gases (M.L López, 2009).

Otros métodos de sensado químico implementan sondas sensibles a gases. Estas celdas electroquímicas (Figura 4.4) son construídas con un electrodo específico de iones y uno de referencia sumergidos en una disolución interna. Esta solución está retenida por una delgada membrana permeable a gases (SISIB, 2013). En particular, cuando una disolución que contiene CO_2 se pone en contacto con la membrana micro porosa, el gas difunde a través de la membrana en la disolución interna y se establece un equilibrio que hace que cambie el pH de la película superficial interna, siendo este cambio detectado por el electrodo de vidrio.

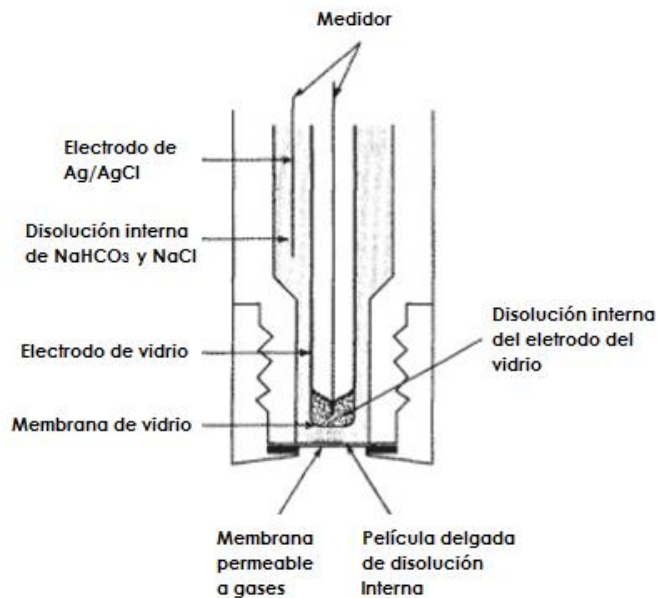


Figura 4. 4: Esquema sonda sensible a dióxido de carbono (SISIB, 2013).

En el año de 1982 K. Persaud y G. Dodd, realizaron la primera publicación de su prototipo de nariz electrónica (K. Persaud, G. Dodd , 1982). En este estudio se analizaron los procesos del olfato biológico. Para esto utilizaron un conjunto de sensores semiconductores de óxidos metálicos, sensores basados en polímeros conductores para detectar, identificar y medir una amplia variedad de compuestos químicos y mezclas.

En la nariz electrónica (Figura 4.5), las moléculas de olor son expuestas a esta, y los patrones químicos presentes en la muestra de aroma son detectados por los sensores. Éstos, a su vez, transforman esta entrada química en una señal eléctrica produciendo para cada aroma un único patrón de respuesta. Estos patrones son designados como huella digital olfativa, la cual contiene idealmente la complejidad del aroma. Finalmente a esta respuesta se le aplican técnicas de reconocimiento de patrones para discriminar, clasificar y/o predecir el tipo de aroma que se está analizando (I. Moreno, R. Caballero, 2009).

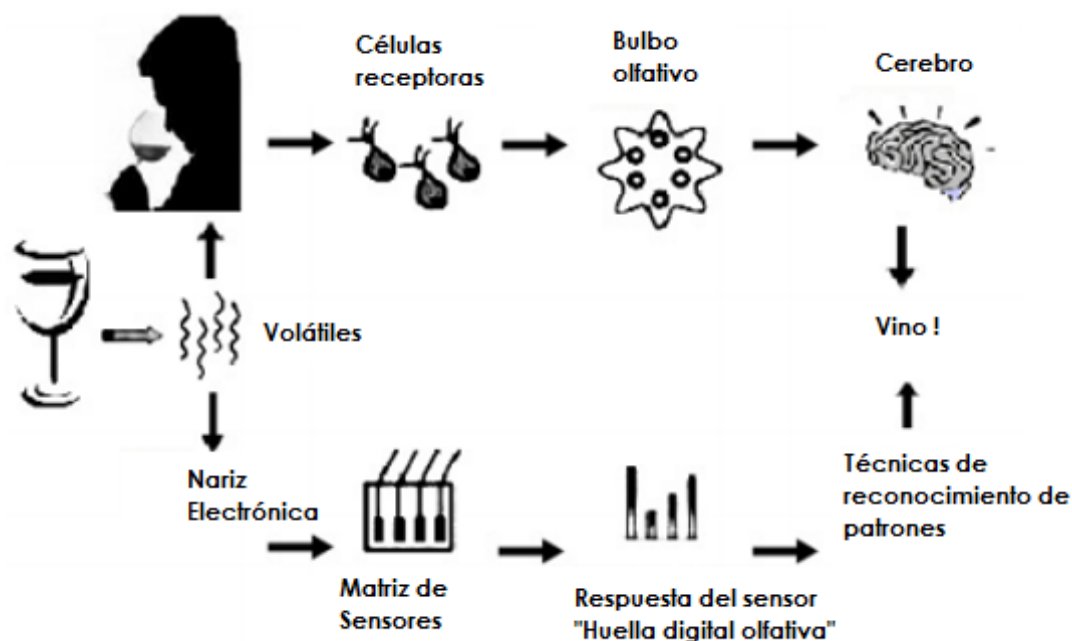


Figura 4. 5: La nariz electrónica y el sistema del olfato humano (C. Pinheiro, M. Rodríguez, G. Schäfer , 2002).

También existen estudios donde se han implementado microbalanzas de cuarzo (QMB), recubiertas con diferentes metaloporfirinas para diagnosticar el cáncer de pulmón (A. Macagnano, et al .2003). Este estudio permitió la identificación correcta del 94% de pacientes con cáncer de pulmón. La frecuencia de resonancia del micro cristal depende de la masa total resonante, la variación de la frecuencia es proporcional a la cantidad de masa añadida y el sensor opera como una microbalanza sensible a masas tan pequeñas como la de un virus.

Honghun Huang y colaboradores, realizaron un estudio de la acetona presente en el aliento de pacientes diabéticos (H. Huang et al , 2004). El análisis se lleva a cabo mediante una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) modificada con una zeolita (Ag+ -ZSM-5). Este sensor exhibió una alta sensibilidad, selectividad y repetibilidad, con un límite de detección de acetona de 0.26 ppm, suficientemente eficaz como para distinguir la respiración de pacientes sanos y de los pacientes diabéticos.

PROTON TRANSFER REACTION MASS SPECTROMETER (PTR-MS)

PTR-MS es una técnica espectroscópica de ionización química que permite analizar moléculas con gran precisión en el rango de pocas partes por trillón de volumen (pptv). En el PTR (Figura 4.6), el vapor de agua es inyectado en un cátodo de fuente de iones, en este cátodo son producidos iones de hidronio (H_3O^+) mediante la reacción de descarga ($\text{e}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + 2\text{e}^-$). Luego de reacciones ion-molécula se produce el hidronio ($\text{H}_2\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}$) con una pureza de más del 99.5% (W. Lindinger, 1998).

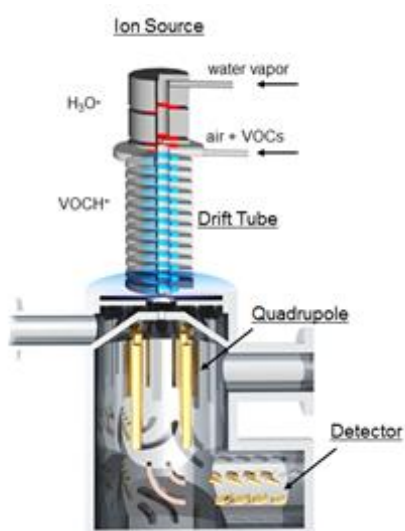
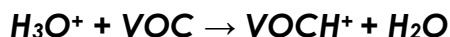


Figura 4. 6: Esquema de Funcionamiento espectrometría por transferencia de protones (PTR-MS) (Baden, 2015).

En el tubo de deriva se inyecta una mezcla de aire y compuestos orgánicos (VOC's) a analizar, llevándose a cabo la transferencia de protones (Ecuación 4.3) del hidronio al VOC's con afinidad protónica superior a la del agua (691 kJ/mol).



Ecuación 4. 3: Reacción de transferencia de protones (PTR-MS).

Posteriormente un campo eléctrico guía a los iones hacia la salida del tubo de deriva, donde serán detectados y analizados en un espectrómetro de masas. Se puede suponer que el número total de iones de H_3O^+ se mantiene constante, esto debido al bajo número de moléculas a analizar, y esto conduce a la ecuación 4.4.

$$[VOCH^+] = [H_3O^+]_0(1 - e^{-k[VOC]t}) \approx [H_3O^+]_0[VOC]kt$$

Ecuación 4. 4: Densidad de iones de VOC en PTR-MS.

Donde $[VOCH^+]$ es la densidad de iones del compuesto orgánico, $[H_3O^+]_0$ es la densidad de iones primarios en ausencia de VOC, k es la constante de velocidad de reacción, t es el tiempo promedio que los iones tienen que pasar la zona de reacción.

La técnica PTR-MS presenta alta sensibilidad para la medición de compuestos orgánicos volátiles. Los VOC's tipo alcoholes, aldehídos, ácidos, aromáticos insaturados, entre otros han sido muy estudiados bajo esta técnica. Además, dado que la mayoría de componentes del ambiente poseen una afinidad protónica menor a la del agua (por ejemplo, N_2 , O_2 , Ar , CO_2 , etc.), no reaccionan con el hidronio. Esto se refleja en que las mediciones y cuantificaciones evitan la interferencia con el fondo ambiental.

4.1.3 Técnicas basadas en espectroscopia láser.

En los últimos años las técnicas basadas en espectroscopía láser han presentado grandes avances para el análisis de moléculas. Las nuevas fuentes láser y configuraciones de operación han hecho posible desarrollar instrumentos cada vez más sensibles, precisos y con límites de detección en el rango de pptv. A continuación se describirá brevemente unas pocas técnicas de espectroscopía láser utilizadas en el estudio de moléculas en el aliento con el fin de complementar esta revisión de técnicas disponibles para el análisis de aliento exhalado.

TUNABLE DIODE LASER ABSORPTION SPECTROSCOPY (TDLAS)

La espectroscopia de absorción láser con diodo sintonizable (TDLAS), es una técnica óptica que combina el método de absorción espectral convencional con un avanzado láser de diodo sintonizable. En TDLAS, la muestra de gas está contenida en una celda y un detector registra la intensidad transmitida del láser. La longitud de onda del láser se escanea de forma repetitiva a través de la frecuencia central u de una línea de absorción del gas (C. Wang, P. Sahay, 2009).

La relación entre la intensidad incidente I_0 del láser y la intensidad de transmisión I , se expresa mediante la Ley de Beer Lambert:

$$I(\nu) = I_0 e^{-\alpha(\nu)L}$$

Ecuación 4. 5: Ley de Beer Lambert.

En la ecuación 4.5, L es la longitud de trayectoria óptica y $\alpha(\nu)$ es el coeficiente de absorción a la frecuencia (ν) . Este coeficiente de absorción es definido como el producto de la sección transversal de absorción $\sigma(\nu)$ y la concentración (n) del gas muestra (molécula cm^{-3}). La absorción se cuantifica con más precisión como una absorción integrada a lo largo de toda la forma lineal de absorción y expresada por una absorbancia A total se define como:

$$A = L \int_0^\infty \alpha(\nu) d\nu = nL \int_0^\infty \sigma(\nu) d\nu$$

Ecuación 4. 6: Absorbancia de moléculas de gas.

El límite de detección (**DL**) en términos de la absorbancia mínima A_{min} se determina por el cambio fraccional mínimo detectable de la intensidad del láser, $\Delta I/I_0$, donde $\Delta I = I_0 - I$. La estabilidad de la fuente de luz y el ruido electrónico del detector se caracterizan por ofrecer una A_{min} del orden de 10^{-2} - 10^{-4} .

CAVITY RINGDOWN SPECTROSCOPY (CRDS)

La espectroscopía Cavity ringdown es una técnica de absorción láser (figura 4.7 a), donde un láser, pulsado en nanosegundos típicamente, incide a través del extremo de un espejo en una cavidad óptica, y la luz queda atrapada entre las superficies de los espejos. La intensidad de la luz en la cavidad decae exponencialmente con el tiempo (Figura 4.7 b) a una velocidad determinada por las pérdidas de ida y vuelta experimentado por el pulso de láser. Estas pérdidas son típicamente debido a la reflectividad finita de los espejos de la cavidad, de absorción óptica, y/o la dispersión.

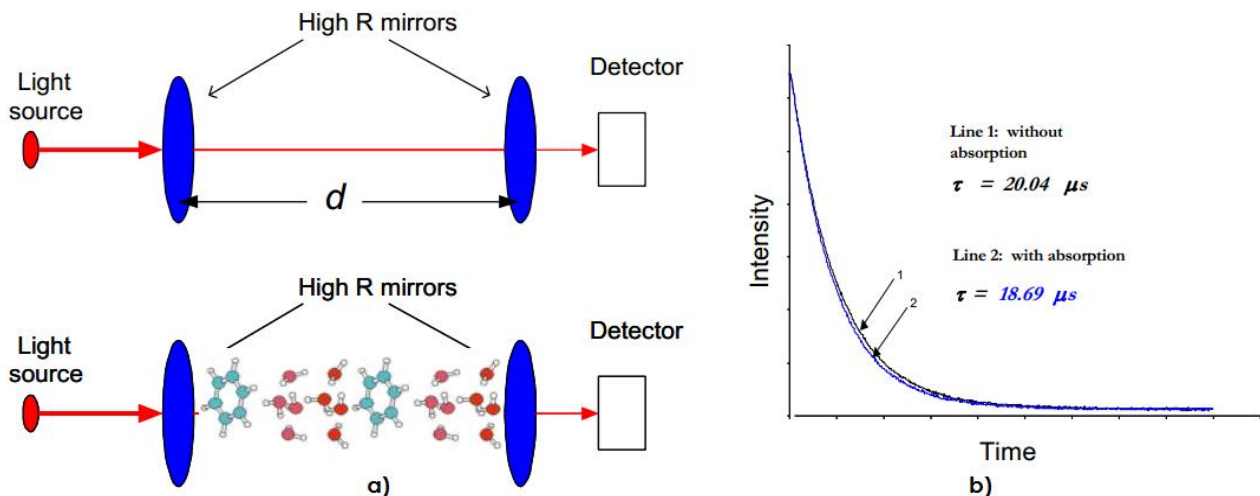


Figura 4. 7: a) En CRDS, la absorción efectiva en la longitud de trayectoria, se incrementa más de 10.000 veces. b) Tiempo ringdown con y sin absorción (C. Wang, P. Sahay, 2009)

El comportamiento de decaimiento exponencial es registrado por un fotodetector situado detrás del segundo espejo. En el caso más simple, donde no hay presencia de moléculas absorbentes, el tiempo de caída (tiempo ringdown) es τ_0 .

Cuando la cavidad óptica contiene una muestra de gas, existen pérdidas adicionales debido a la absorción de la muestra. El tiempo de decaimiento está determinado por la velocidad de la luz (**c**), la reflectividad de los espejos (**R**), la distancia entre los espejos (**d**), y la longitud de trayectoria de absorción (**L**) en caso que sólo se llene una porción de la cavidad con el gas. El tiempo de decaimiento se puede calcular usando la ecuación 4.7

$$\tau = \frac{d}{c(1 - R + \sigma(v)nd)} = \frac{d}{c(1 - R + \sigma(v)nl)}$$

Ecuación 4. 7 Tiempo de caída ó tiempo ringdown en presencia de gas en la cavidad.

Experimentalmente, se mide el tiempo de vida ringdown con absorción (τ) y sin absorción (τ_0). Por lo tanto, la absorbancia puede ser reescrita como:

$$Absorbancia (A) = \sigma(v)nl = \frac{d}{c} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right)$$

Ecuación 4. 8: Absorbancia de una molécula en espectroscopía Ringdown.

Dado que los espejos reflectantes de ~99,9985% en el infrarrojo cercano (NIR) y la medición de $\Delta T_o / T$ es aproximadamente de 10^{-3} , el límite de detección de la absorbancia de una sola pasada es del orden de 10^{-8} cm^{-1} (G. Berden, 2000). De esta forma la técnica Cavity ringdown presenta una alta sensibilidad debido a los múltiples caminos ópticos del láser en la ruta de absorción, además puede ser acoplado a fuentes de láser de alta resolución.

PHOTOACOUSTIC SPECTROSCOPY (PAS)

La espectroscopia fotoacústica también es una técnica de absorción láser, pero a diferencia de las anteriores técnicas requiere un micrófono sensible. Este transductor detecta las ondas acústicas generadas por la absorción de radiación pulsada o modulada a través de la transferencia de energía de las moléculas absorbentes a las moléculas circundantes (C. Wang, P. Sahay, 2009). En PAS (figura 4.8), el medio absorbente, por ejemplo una muestra de gas, absorbe la radiación láser a una frecuencia intrínseca de la molécula. Subsecuentemente, la energía del fotón absorbido por el gas se traduce en energía cinética de las moléculas de gas o variaciones de la presión del gas a través de procesos de relajación no radiante.

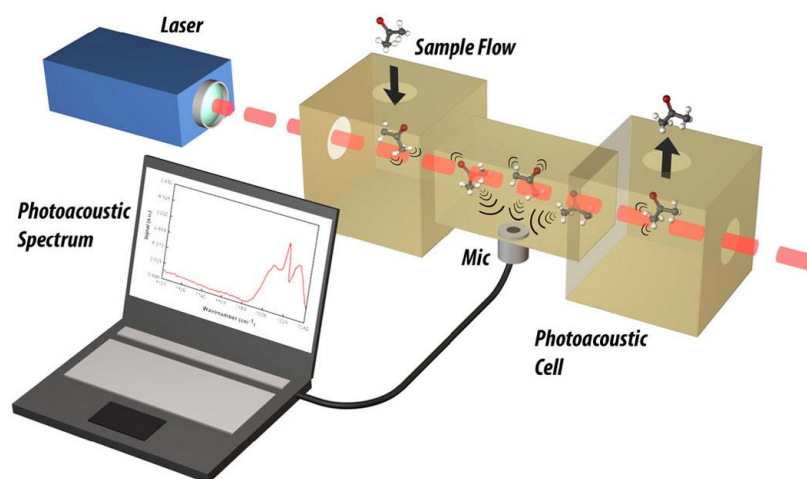


Figura 4. 8: Esquema de funcionamiento espectroscopia fotoacústica (E. Holthoff, 2010).

El límite de detección (A_{min}) en PAS en términos de absorbancia, se determina por la señal mínima detectable (presión sonora) (P_{min}), la potencia del

láser (**WL**), la constante de configuración de la celda PAS (**C**), y la longitud de trayectoria de absorción del láser (**L**).

$$Absorbancia = A_{min} = \frac{P_{min}L}{CW_l}$$

Ecuación 4. 9: Límite de detección de una molécula en espectroscopía fotoacústica.

El límite de detección (A_{min}) promedio del sistema PAS es del orden de 10^{-6} a 10^{-8} , cuando la presión mínima es del rango de 10^{-5} a 10^{-7} Pa, la longitud de trayectoria de 10 cm, la configuración de 2,000 Pa cm/W y una potencia en el láser de 1 W. Dependiendo de las diferentes moléculas de gas, las trazas moleculares pueden ser detectadas por la técnica de PAS en ppmv a niveles de ppbv.

CAPITULO 5: METODOS Y PROCEDIMIENTOS

El estudio de compuestos orgánicos presentes en el aliento contempla una población de 35 pacientes. Este grupo de personas se dividió en el presente estudio en dos subgrupos con estatus fisiológico claramente determinado por el grupo de medicina interna del Hospital General. El subgrupo 1 está conformado por 27 personas metabólicamente sanas y el subgrupo 2 por 8 personas con diabetes mellitus tipo 2. En base al subgrupo 1 se plantea la definición del nivel basal de metabolitos en el aliento de la población sana. El propósito de incorporar un número de pacientes diabéticos fue con el fin de identificar los marcadores asociados a la diabetes, y discriminar otros metabolitos no relevantes.

Las muestras de aliento de los pacientes sanos y diabéticos fueron tomadas en el departamento de neumología del HGM, con la asesoría y colaboración de la Dra. Yolanda Gutiérrez encargada del mismo departamento. Las muestras de pacientes en estados críticos de diabetes fueron tomadas en la unidad de urgencias del HGM. Posteriormente las muestras fueron analizadas en el centro de ciencias de la atmósfera de la UNAM.

Previo al análisis de muestras de aliento de los pacientes, se realizaron pruebas piloto para establecer un método estándar de toma de muestras. La validación del método permitió realizar tanto la toma de muestras, como el análisis de las mismas, y realizar un estudio íntegro y sistemático del análisis de los compuestos presentes en el aliento.

5.1 Pruebas piloto de CG-SM

Las pruebas piloto incluyeron métodos para preconcentrar los VOC's presentes en el aliento y la eliminación de la humedad muestras. Otras pruebas incluyeron la eliminación el aire del espacio muerto anatómico, y pruebas de condiciones cromatográficas para obtener el mejor análisis de las muestras de aliento. Además, las pruebas piloto permitieron constatar que la información obtenida es producto de compuestos orgánicos provenientes del aire alveolar, y que sus datos no están siendo influenciados por otras fuentes.

5.1.1 Preconcentración de VOC's y eliminación de la humedad del aliento.

Para los propósitos de este proyecto es fundamental poder preconcentrar los compuestos producto del metabolismo humano, y la eliminación de la humedad de la muestra. Si no se realiza la eliminación de la humedad de la muestra, el agua puede cristalizarse debido a las diferentes temperaturas que se utilizan en las trampas cromatográficas, y el paso de alguno de cristales de agua por la columna cromatográfica podría romper el recubrimiento de la fase estacionaria.

Como solución para la preconcentración de los VOC's y la eliminación de vapor de agua presente en el aliento, se implementaron tubos multilecho (figura 5.1a). Estos tubos fueron empaquetados con materiales específicos que tienen la capacidad de adsorber compuestos orgánicos, y los cuales son hidrofóbicos. En este proyecto se implementaron 3 camas de compuestos adsorbentes (figura 5.1b), de mayor a menor fuerza de adsorción el Carbosieve S-III, Carbopack B y Carbopack C. La muestra siempre ingresa al cartucho por Carbopack C (adsorbedor menos fuerte) y luego por Carbopack B hasta Carbosieve S-III, siendo este último el más fuerte adsorbedor. La salida ó desorción de los compuestos hacia el cromatógrafo, será pasando el flujo de helio desde Carbosieve S-III, pasando por Carbopack B hasta llegar al Carbopack C. La combinación de estos tres tipos de adsorbentes permite la captación de un amplio número de VOC's.

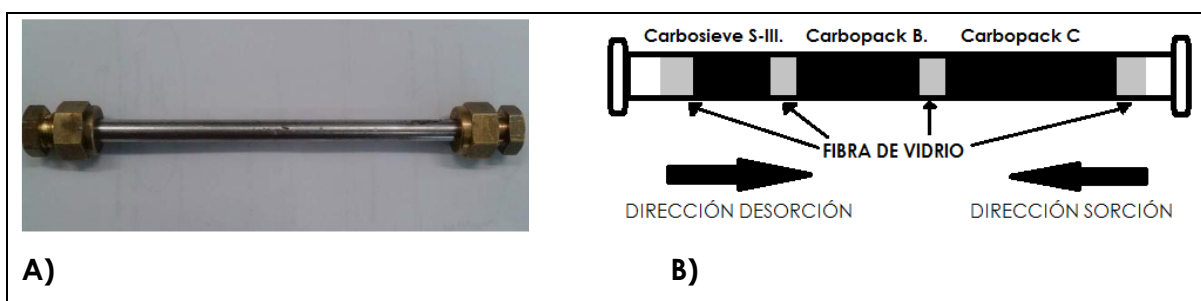


Figura 5. 1 Tubos Multilecho. A) cartucho adsorbedor de VOC's. B) composición de los cartuchos.

Para la eliminación del vapor de agua se escogió el método de "purga en seco" (J. Gawlowski, 2000). Este método consiste en pasar un flujo de 100 mL/min

de gas acarreador (helio), a una temperatura de 20°C en los tubos multilecho cargados previamente con la muestra a estudiar. El flujo de helio arrastra las moléculas de agua, y los compuestos orgánicos seguirán atrapados en las mallas de los materiales adsorbedores. Después de la purga en seco, se calienta el cartucho a 300°C con un flujo en su interior de 100 mL/min de helio, el cual acarrea los compuestos hacia el cromatógrafo de gases.

Como complemento al método de purga en seco, se implementó el tubo de Nafión ó membrana de intercambio iónico (figura 5.2). En el tubo de nafión el agua se mueve a través de las paredes de la membrana y se evapora en el aire o gas circundante en un proceso denominado pre-evaporación. En el proceso de toma de muestra, el paciente exhala directamente sobre una boquilla conectada al tubo de Nafión, siendo este el primer filtro de humedad que pasa la muestra de aliento, seguido de la purga en seco.



Figura 5. 2: Tubo de Nafión que elimina la humedad del aliento.

5.1.2 Pruebas en el cromatógrafo de gases.

Las pruebas piloto se llevaron a cabo en el Centro de Ciencias de la Atmosfera (CCA). Las pruebas contemplaron variaciones de parámetros en el cromatógrafo, y un replanteamiento de los nuevos métodos para el análisis de las muestras. Los parámetros cromatográficos (tabla 5.1) se escogieron de forma que pudiera observarse en el cromatograma eficientemente los compuestos del aliento humano.

PARÁMETROS CROMATÓGRAFICOS VOC'S ALIENTO 5			
TERMODESORCIÓN DEL CARTUCHO		COLUMNA CROMATOGRÁFICA	
Temperatura Inicial	300 °C	Columna capilar	No polar, DIMETIL POLISILOXANO, QUAEDREX (60m, 1µm, 0.25 mm)
Temperatura final	300 °C	Gas portador y flujo	He (0.730 mL/min)
Tiempo	6 min	Programa de Temperatura	-20°C (2.3 min), luego a 5°C/min hasta 250°C (5 min)
Flujo	50 mL/min	Tiempo total	61.3 min
TERMODESORCIÓN DEL PTV		ESPECTRO DE MASAS	
Temperatura Inicial	-20 °C	Modo de Ionización	Impacto electrónico (IE)
Temperatura final	350 °C	Energía de ionización	70 eV
Tiempo	2.12 min	Barrido de masas	16-200 uma, modo SCAN
Flujo	0.730 mL/min	Temperatura	230°C (Cámara fragmentación)

Tabla 5. 1: Parámetros del cromatógrafo de gases

5.2 Caracterización fisiológica de la población.

El grupo de medicina interna del Hospital General México (HGM) definió el estatus fisiológico de los voluntarios de la prueba. Se realizaron estudios hematológicos con el fin de definir las dos sub-poblaciones de estudio: 27 pacientes metabólicamente sanos y 8 pacientes con pacientes con diabetes o alteraciones en su metabolismo. Los estudios hematológicos incluyeron las siguientes pruebas:

- Biometría hemática (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos, eritrocitos, hemoglobina, plaquetas etc.).
- Urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas y bilirrubina, albumina, y múltiples proteínas.
- Hemoglobina glucosilada y curva de tolerancia a la glucosa.
- Factores inmunológicos como la proteína C reactiva.

Para la prueba hematológica (figura 5.3), los pacientes debían presentarse con 12 horas de ayuno y un formato debidamente diligenciado con los antecedentes heredo-familiares previamente suministrado por el HGM.



Figura 5. 3: Voluntarios de prueba de Curva de tolerancia de la glucosa.

Como inicio a la prueba hematológica, a cada paciente se tomó dos tubos de sangre de 5 mL. Posteriormente se dio inicio a la prueba de Curva de tolerancia a la glucosa, los pacientes ingirieron un concentrado de 75g de glucosa anhidra (Figura 5.4), diluida en 250ml de agua y jugo un limón; esto con el fin de estudiar la respuesta del páncreas a una abrupta recarga de glucosa. Se realizaron cuatro tomas de sangre, cada una en intervalos de media hora. Se espera que en los pacientes sanos, el páncreas genere la insulina suficiente como bajar los niveles de glucosa en sangre a menos de 140 mg/dL, después de dos horas de la ingesta.



Figura 5. 4: Glucosa anhidra para prueba de tolerancia a la glucosa

5.3 Protocolo Toma de muestras de aliento en el HGM

Se tomaron en totalidad 70 muestras de aliento tanto de pacientes sanos como diabéticos. En la unidad de neumología del HGM, se tomaron muestras de 27 personas sanas y 3 personas recientemente diagnosticadas como diabéticas. En la unidad de urgencias del HGM se tomaron muestras de 5 pacientes en estados críticos de la enfermedad, con la idea de tener mayor contraste.

Para tener una forma sistemática y organizada para la recolección de las muestras, se desarrolló un protocolo de toma de muestras con las indicaciones tanto del paciente como del personal que toma la muestra:

5.3.1. Preparación de los pacientes y materiales

Previo a la colección de aliento exhalado, el paciente debe de seguir las siguientes instrucciones:

- Guardar ayuno durante 12 horas.
- No utilizar crema dental el día de la toma de muestra de aliento, sólo lavar los dientes con agua y cepillo dental.
- No realizar ningún tipo de actividad física durante el ayuno.
- Llegar puntual a la cita (la toma de muestra se realizará en un horario de 7:00 a 9:00 am).
- El paciente deberá llenar la plantilla de datos personales y antecedentes familiares (anexo 1).

Materiales

Antes de proceder con la toma de aliento de los pacientes, el encargado deberá de asegurarse que en el rack de muestreo está presente:

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| • Pinzas para la nariz. | • Flujómetro |
| • Algodón y alcohol | • Bomba de vacío elite 801 |
| • Boquillas | • Mangueras |
| • Tubo de Nafión | • Conectores |
| • Bolsas tedlar FlexFoil® PLUS | • Vasos plásticos |
| • Tubos adsorbedores VOC's | |

5.3.2 Acondicionamiento de cartuchos multilecho

Previo al análisis de muestras en el cromatógrafo de gases, se debe realizar un acondicionamiento térmico de los tubos multilecho. En el acondicionamiento se eliminan los compuestos que han sido atrapados por el cartucho, ya sea debido al empaquetamiento o porque se ha realizado previamente la termodesorción de una muestra. El acondicionamiento (TO-17, 1999) se lleva a cabo calentando el cartucho a 350°C, y simultáneamente circulando un flujo de nitrógeno en su interior durante 3 horas (figura 5.5). Luego del acondicionamiento de los cartuchos, estos se deben tapar con férulas de teflón y tapones de acero inoxidable. Posteriormente se deben almacenar con carbón activado dentro de un refrigerador hasta la próxima carga de una muestra.



Figura 5. 5: Equipo de acondicionamiento de cartuchos absorbentes.

5.3.3 Toma de muestra de aliento

A continuación se presentan los pasos a seguir tanto de los pacientes como del personal encargado de la toma de aliento exhalado:

- El paciente deberá enjuagarse la boca con suficiente agua antes de la toma de aliento. Repetir la acción tres veces.
- El personal encargado conecta en serie la boquilla, el tubo de nafión y la bolsa tedlar.
- El personal encargado deberá explicar a los pacientes, de forma dinámica el procedimiento de toma de muestra.

- El paciente debe permanecer sentado respirando en condiciones estables (sin agitación) durante el procedimiento de toma de muestra.
- El paciente inhalará y exhalará lo más profundo que pueda para ventilar los pulmones y exhalar la mayor cantidad de aire posible.
- El paciente debe colocar la pinza para la oclusión de la nariz, asegurándose que la espiración solo sea por la boca.
- El paciente debe tomar aire lo más profundo que pueda.
- Posteriormente suministrará una primera muestra de aire de 300 mL correspondiente al aire de todo el espacio muerto, y un poco de aire alveolar (Figura 5.6 a).
- Sin volver a tomar aire, el paciente suministrará una segunda muestra de 1L netamente de aire alveolar en la bolsa tedlar (Figura 5.6 b).



Figura 5. 6: Toma de muestra de aliento: a) 300mL del espacio muerto, b) 1L de aire alveolar.

- Colocar la bolsa FlexFoil® PLUS con la muestra en un lugar adecuado.

5.3.4 Preconcentración de muestras en tubos adsorbentes

Posterior a la recolección de muestras de aliento en bolsas tedlar, se preconcentran los compuestos en cartuchos adsorbentes. El sistema de preconcentración (figura 5.7) tiene la posibilidad de realizar simultáneamente el proceso para dos muestras. La bomba elite 801 se conecta a la división de los cartuchos que van a ser cargados con muestras. Posteriormente a cada cartucho

se conecta su respectiva bolsa tedlar, cabe mencionar que cada paciente tiene su propia bolsa tedlar y cartucho adsorbedor, debidamente numerado.



Figura 5. 7: Preconcentración de las muestras de aliento en cartuchos adsorbedores.

5.3.5 Limpieza de bolsas tedlar

Las bolsas Tedlar presentan un costo relativamente elevado, dado que se usa un buen número de ellas. Para reducir los costos se evaluó e implementó un método para la limpieza y reúso de éstas (anexo 2). A continuación se presenta una lista de los pasos a seguir para limpieza de bolsas después de su uso:

1. Lavar la bolsa tedlar con aire cero durante 3 minutos.
2. Llenar la bolsa tedlar al 75% de su volumen total con aire cero. Calentar la bolsa en la estufa por 15 minutos a 90 °C.
3. Conectar la terminal de la bomba de vacío (que está dentro del horno), a la bolsa tedlar durante 3 minutos.
4. Repetir los pasos anteriores 1 vez más.
5. Llenar la bolsa tedlar con nitrógeno al 75% de su volumen total. Calentar la bolsa en la estufa por 30 minutos a 90 °C.
6. Conectar la terminal de la bomba de vacío (que está dentro del horno), a la bolsa tedlar durante 3 minutos. Almacenar adecuadamente.

5.4 Análisis del Aliento por CG-SM

Las muestras recolectadas en cartuchos adsorbedores en el HGM, fueron trasladadas hasta el CCA para su posterior análisis. El CCA cuenta con un cromatógrafo de gases Agilent 7890 modelo 7890AGC System, y se encuentra

acoplado a un espectrómetro de masas (SM). Los cromatogramas son analizados en el software de Agilent ChemStation.

5.4.1 Análisis de muestras en el Cromatógrafo de gases Agilent 7890

El cromatógrafo de gases Agilent modelo 7890AGC System (figura 5.8) del CCA, cuenta con una adecuación para termodesorción de muestras atrapadas en cartuchos adsorbentes. En la termodesorción (tabla 5.1), un flujo de helio de ultra pureza direcciona los VOC's hacia vaporizador con temperatura programada (PTV) en el cromatógrafo, el cual es usado como trampa criogénica para los VOC's previo a la corrida de la muestra.



Figura 5. 8: Cromatógrafo Agilent modelo 7890AGC. Recuadro interior termodesorción de la muestra.

Para el análisis de las muestras en el cromatógrafo de gases, se ha diseñado un método de trabajo llamado "VOC's aliento 5" (tabla 5.1). Cuando inicia la corrida en el cromatógrafo, el PTV pasa de -20°C a 350°C a una velocidad de $360^{\circ}\text{C}/\text{min}$, transfiriendo todos los compuestos hacia la columna capilar de 60 m de longitud. Seguidamente comienza la separación de los compuestos dentro de la columna cromatográfica, empezando a -20°C con un ligero calentamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta llegar a 250°C en un tiempo total de 61.3 minutos.

Posteriormente los compuestos fueron analizados con el espectrómetro de masas, en modo impacto electrónico a 70 eV, en un barrido de 16 a 200 uma. La información de los compuestos se visualizó y analizó en el software de Agilent ChemStation. Este software permite observar el cromatograma de la muestra (figura 5.9), hacer pureza de pico de cada compuesto, identificar compuestos, e integrar los picos entre otras.

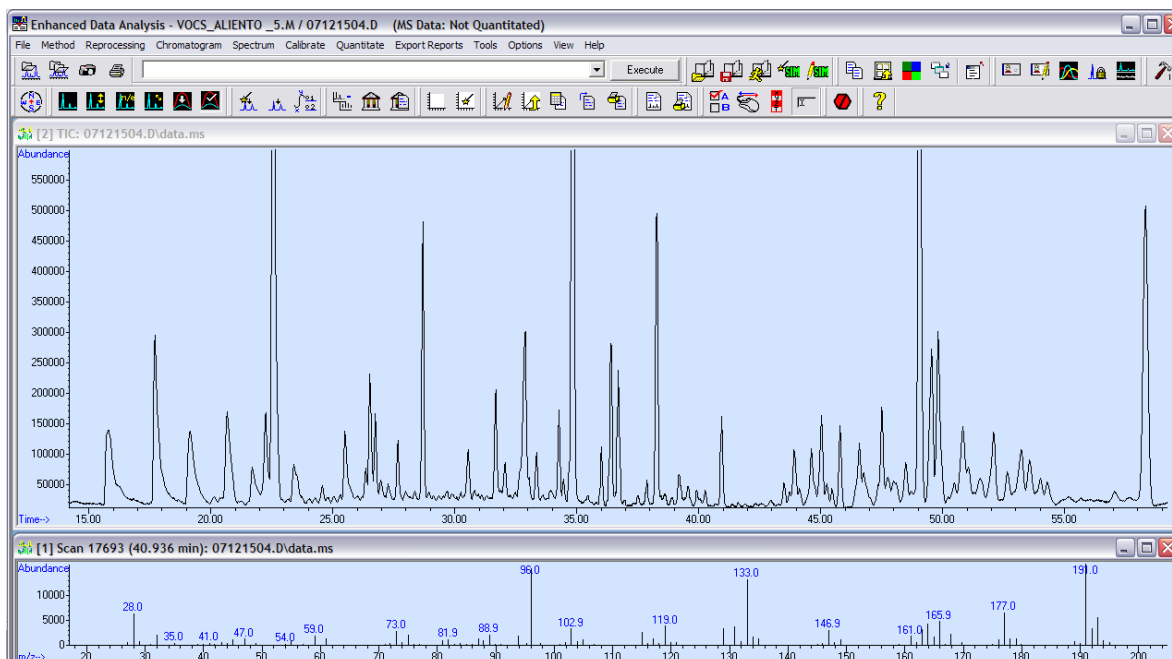


Figura 5. 9: Cromatograma típico de una muestra de aliento, abajo espectro de masas de un pico al tiempo 40.936 min. Software ChemStation

5.4.3 Identificación de metabolitos presentes en el aliento

La identificación de los compuestos en el aliento se llevó a cabo mediante métodos directos e indirectos. Los métodos directos incluyeron la implementación de estándares gaseosos (figura 5.10 a) y la preparación de bulbos con muestras líquidas PolyScience (figura 5.10 b). Los estándares fueron inyectados en el cromatógrafo y de esta forma se pudo tener un patrón de los tiempos de retención de algunos compuestos orgánicos. El estándar de calibración en fase gaseosa de marca Spectra, tiene un contenido de 56 compuestos y una concentración nominal de 1ppmv (parte por millón en volumen) de cada compuestos.



Figura 5. 10: Calibración con estándares: a) Estándar gaseoso marca Spectra, b) KIT de estándares líquidos PolyScience.

Algunos compuestos fueron identificados de forma tentativa por el programa ChemStation. Este software cuenta con cuatro librerías, entre ellas la correspondiente al National Institute of Standards and Technology (NIST), estas librerías tienen una cuantiosa base de datos de los espectros de compuestos químicos cuando son fragmentados por impacto electrónico a energías de 70 eV.

5.4.4 Cuantificación indirecta e integración de los compuestos

En este proyecto se realizó un análisis exploratorio de compuestos presentes en el aliento. Dado que realizar una cuantificación directa de los compuestos requiere el uso de costosos estándares de referencia y calibraciones lineales de cada compuesto en el aliento, la cuantificación directa no fue necesaria dado los objetivos de esta tesis.

Para tener una idea de la abundancia de los compuestos en el aliento se llevó se optó por hallar el área bajo la curva de cada pico correspondiente a un compuesto presente en el aliento. En el software ChemStation se impusieron restricciones correspondientes a la integración de las áreas, parámetros tales como el área inicial rechazada, ancho de pico, y umbrales de integración fueron tenidos en cuenta (figura 5.11).

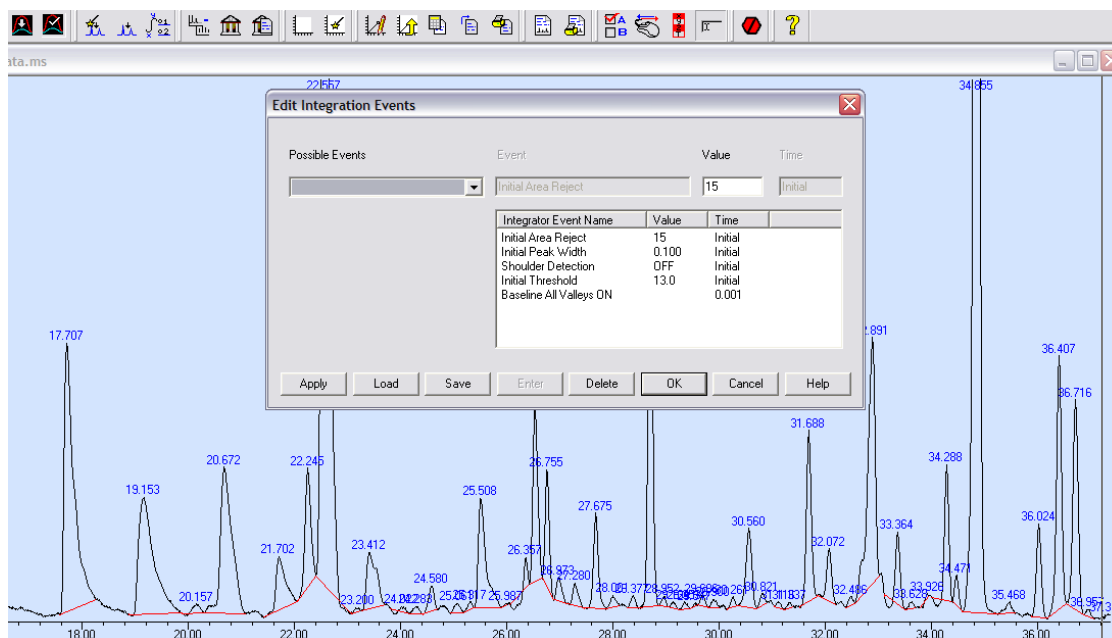


Figura 5. 11: Integración de picos de compuestos. Software ChemStation.

5.6 Análisis de datos

El análisis de datos se dividió en cuatro fases:

1. La caracterización fisiológica de los pacientes con base a parámetros fisiológicos y valores de referencia de estos.
2. El análisis de los compuestos presentes en el aliento y sus respectivas abundancias en las poblaciones de estudio.
3. La determinación de la línea basal de compuestos presentes en el aliento, con sus respectivos errores estándares.
4. Finalmente un análisis de componentes principales de los compuestos presentes en el aliento de la población de estudio.

5.6.1 Caracterización fisiológica de pacientes

Con base a en los resultados de las pruebas hematológicas de los pacientes, se clasificó la población bajo parámetros tales como:

- Glucosa promedio en sangre, tomada tanto en pacientes sanos, diabéticos recientemente diagnosticados y diabéticos en estado crítico.
- Hemoglobina glicosilada y curva de tolerancia a la glucosa, en pacientes sanos y diabéticos recientemente diagnosticados.

- Índice de masa corporal (IMC), Colesterol total y triglicéridos, en pacientes sanos y diabéticos recientemente diagnosticados.

La clasificación de los pacientes se realizó mediante los valores de referencia de las normas oficiales mexicanas y la biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (NLM The National Library of Medicine). Los parámetros y valores de referencia se enlistan en la tabla 5.2.

PARÁMETROS DE CLASIFICACIÓN PACIENTES			
DIABETES MELLITUS			
PARÁMETRO	SANO	PREDIABÉTICO	DIABÉTICO
Glucosa ayuno	<100 mg/dL	≥110 mg/dL y <126 mg/dL	≥126 mg/dL
Glucosa promedio ó glucemia posprandial de 2 horas	<140 mg/dL	≥140 mg/dL y <200 mg/dL	≥200 mg/dL
Hemoglobina glicosilada (HbA1c)*	≤5.7%	≥5.7% y ≤6.4%	≥6.5%
OTROS			
PARÁMETRO	SANO	IRREGULAR	ENFERMO
IMC	>18 y <25 Recomendable	>25 y <27 Sobrepeso	>27 Obesidad
COLESTEROL**	<200 mg/dL	≥200 mg/dL ≤239 mg/dL	≥240 mg/dL
TRIGLICERIDOS**	<150 mg/dL	≥150 mg/dL <200 mg/dL	≥200 mg/dL

Tabla 5. 2: Parámetros de clasificación de pacientes según (NOM-015-SSA2, 2010). * (ADA, 2015) . ** (NOM-037-SSA2, 2002).

5.6.2 Compuestos presentes en el aliento

Se ha resumido en una matriz de datos los compuestos hallados en el aliento de la población. Con el fin de observar diferencias en el aliento de personas sanas y diabéticas, se realizó un diagrama de barras de las abundancias de compuestos en el aliento de ambas poblaciones. Con este mismo fin se graficaron los niveles de glucosa promedio en el aliento y el área bajo la curva de acetona de cada paciente.

El diagrama de barras genera solo una información visual de las diferencias en el aliento de los pacientes sanos y diabéticos. Así, que se optó por realizar un análisis de componentes principales (PCA) para conocer las relaciones entre los pacientes y los compuestos. En las secciones subsiguientes se proporcionan detalles de estos procedimientos.

5.6.3 Análisis de componentes principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica de estadística multivariada para la síntesis de información. En el PCA se realiza una reducción del número de variables con la pérdida mínima de información posible. Las componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales de la base de datos, siendo estas independientes entre sí (Gurrea, 2001).

En el PCA, en primera instancia se estudian las correlaciones que se presentan entre los metabolitos de los pacientes sanos y diabéticos. En segundo lugar se transforma el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables incorrelacionadas entre sí, o sea que no tenga repetición o redundancia en la información. Este nuevo conjunto son las componentes principales. Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra. (Diazaraque, 2006).

El análisis de componentes principales fue realizado gracias al programa estadístico: R Core Team. 2015.

CAPITULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentarán los resultados obtenidos en la tesis, simultáneamente se interpretarán y discutirán los aspectos más relevantes. Los resultados se presentarán comenzando desde la caracterización de los pacientes en el hospital General de México, seguido por el análisis general y estadístico de las muestras de aliento.

6.1 Caracterización fisiológica de pacientes

La caracterización fisiológica de los pacientes se llevó a cabo mediante la evaluación de parámetros asociados a la diabetes y otros parámetros. Los parámetros asociados a la diabetes fueron: Glucosa promedio en sangre o posprandial de 2 horas, Curva de tolerancia a la glucosa y hemoglobina Glicosilada. Los otros parámetros de evaluación de los pacientes fueron el índice de masa corporal (IMC), el colesterol total y los triglicéridos (ver tabla 6.1).

RESUMEN POBLACION DE ESTUDIO						
Población	Edad	Sexo	IMC	Glucosa promedio.	Colesterol Total	Triglicéridos
Sanos	35.3 ± 10.2	16F, 11M	23.8 ± 3.1	114.7 ± 53.2	168.7 ± 19.2	112.0 ± 62.3
Diabéticos Recientes	49.0 ± 5.9	3F, 0M	25.5 ± 0.9	203.5 ± 13.8	232.7 ± 42.7	224.0 ± 78.3
Diabéticos Críticos	57.2 ± 13.3	2F, 3M	NA	291.6 ± 118.0	NA	NA

Tabla 6. 1: Resumen datos fisiológicos de la población de estudio.

6.1.1 Glucosa promedio en sangre o posprandial de 2 horas.

La glucosa promedio en sangre fue la única prueba en la que se contó con toda la población de estudio, estos fueron: pacientes sanos, diabéticos de reciente diagnóstico y diabéticos en estado crítico. Como se mencionó en el capítulo de métodos tabla 5.2, los criterios de caracterización fisiológica se basaron en la Norma oficial Mexicana 015-SSA2 "*para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*".

En la norma (NOM-015-SSA2, 2010), se especifica que los niveles de glucemia promedio y posprandial de 2 horas en personas sanas es menor de 140 mg/dL, en pacientes pre diabéticos de 140 a 200 mg/dL, y los valores superiores de 200 mg/dL indican un diagnóstico de diabetes en los pacientes.

En la figura 6.1, se muestran los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de: 27 pacientes sanos (barras en verde), 3 pacientes recientemente diagnosticados con diabetes (barras en azul), y 5 pacientes en estado crítico de diabetes (barras en negro).

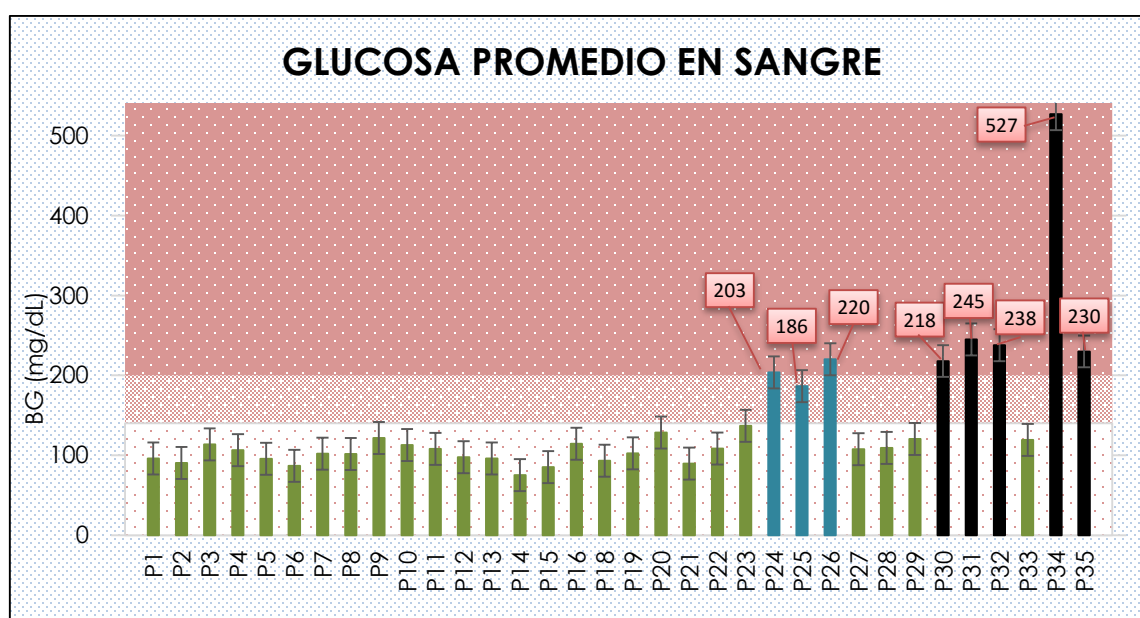


Figura 6. 1: Glucosa promedio de pacientes. En verde pacientes sanos, azul diabéticos de reciente diagnóstico y en negro pacientes en estado crítico de diabetes.

En la figura 6.1, el paciente P25 no logra pasar el límite de 200 mg/dL, y según esta prueba no sería un paciente diabético sino pre diabético al presentar 186.4 mg/dL de glicemia. El paciente P24 apenas logra pasar el límite con 203.8 mg/dL. Los demás pacientes sanos presentaron valores que estuvieron en el rango de lo previsto. Los pacientes en estado crítico suministraron la muestra de aliento en la unidad de urgencias del HGM, lugar donde estuvieron internados debido a complicaciones que se especifican en la tabla 6.2. Los valores de glicemia estuvieron en el rango esperado, pero es necesario hacer hincapié que todos siguen tratamiento inyectando unidades de insulina.

COMPLICACIONES PACIENTES CON DIABETES				
Paciente	Edad (Años)	Horas sin Insulina	Glicemia Promedio (mg/dL)	Complicación
P30	45	NA	218	3 días internado con vómito.
P31	48	~12	245	Insuficiencia Renal.
P32	46	~12	238	Problema ocular.
P34	73	~35	527	Parálisis facial y corporal derecha.
P35	74	~12	230	Necrosis de pie derecho, amputación.

Tabla 6. 2: Complicaciones pacientes en estado crítico de diabetes.

6.1.2 Curva de tolerancia a la glucosa

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó a los pacientes sanos, y los diabéticos que mediante esta prueba fueron diagnosticados. En la figura 6.2 Gluc-0 es la medida de los niveles de glucosa plasmática en ayuno de los pacientes. Posteriormente los pacientes reciben un concentrado de glucosa anhidra y en intervalos de media hora se toman las muestras sanguíneas, Gluc+30, Gluc+60, Gluc+90 y Gluc+120 son las medidas respectivamente de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos posterior a la ingesta de glucosa.

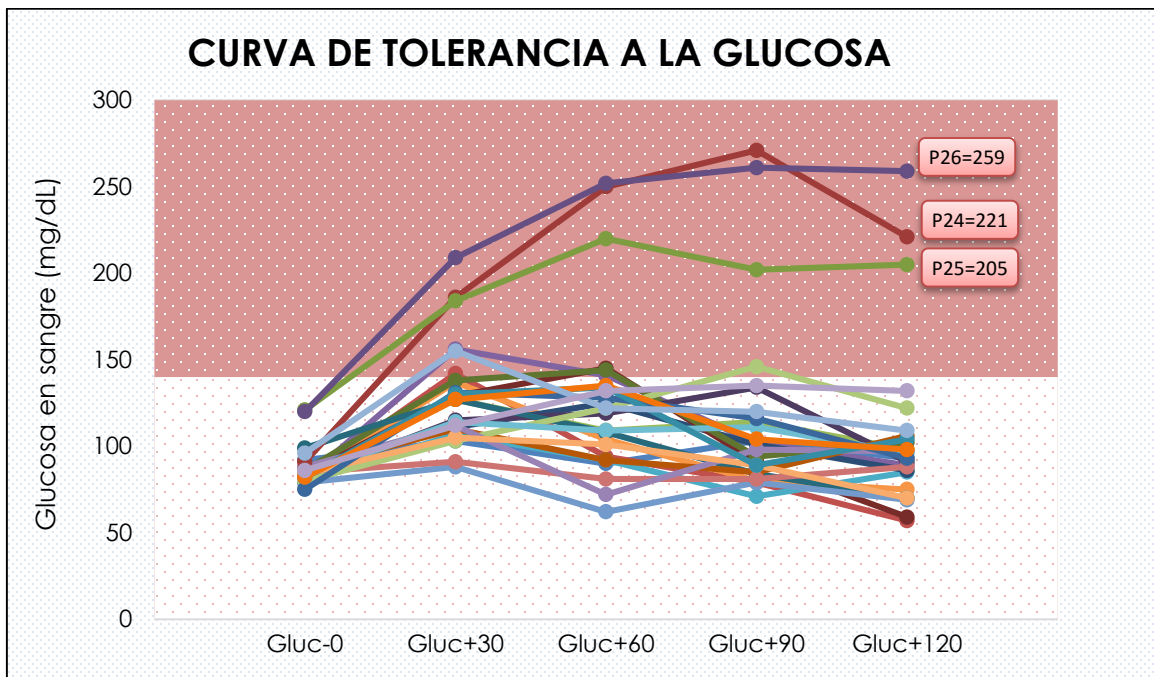


Figura 6. 2: Curva de tolerancia a la Glucosa. Valores de glicemia cada 30 min posterior a la ingestión de glucosa anhidra

En la figura 6.2 se puede observar que los pacientes 24, 25 y 26, no disminuyeron sus niveles de glucosa plasmática a menos 140 mg/dL después de 2 horas de la ingesta de glucosa anhidra. Dado estos valores, y según la norma oficial mexicana (NOM-015-SSA2, 2010) estos pacientes son diabéticos. En estos pacientes el páncreas no produce la suficiente insulina o bien no es captada por las células de forma adecuada debido a diversos factores (Síndrome de resistencia a la insulina).

6.1.3 Hemoglobina glicosilada

La prueba sanguínea de hemoglobina glicosilada fue tomada cuando los pacientes se encontraban en ayuno. Esta prueba se realizó a los pacientes sanos, y los diabéticos que mediante esta prueba fueron diagnosticados. En la figura 6.3, se puede observar en barras verde los pacientes sanos y en barras azul los pacientes recientemente diagnosticados, P24, P25 y P26 quienes presentaron niveles de hemoglobina glicosilada de 6.49%, 6.55% y 6.15 % respectivamente.

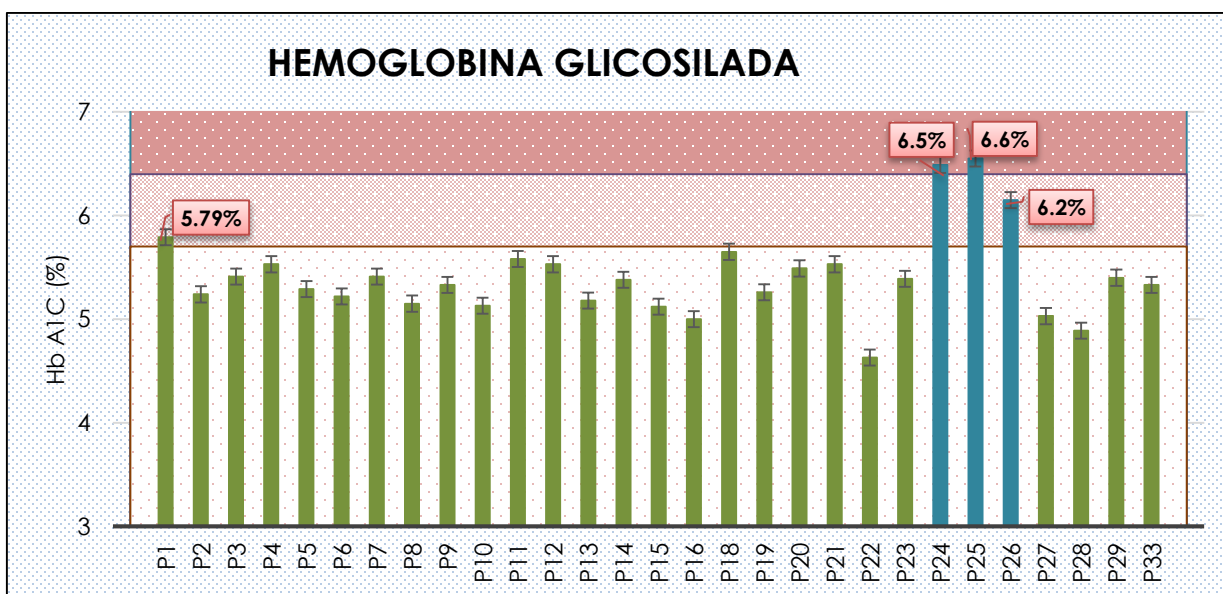


Figura 6. 3: Hemoglobina glicosilada de la población. Azul pacientes recientemente diagnosticados, verde pacientes sanos. Límite de referencia 5.7 6.4% (tabla 5.2).

Según la Asociación Americana de diabetes, el límite de referencia para pacientes sanos es menor o igual 5.7% (ADA, 2015). Dado esto el paciente P1, que presenta un valor HbA1C de 5.79% ha superado por poco el límite de los sanos, no obstante la glucosa promedio y la curva de tolerancia a la glucosa no manifestaron indicios de prediabetes. Así mismo (ADA, 2015), presenta que valores de HbA1C

superiores a 6.4% son suficientes para un diagnóstico de diabetes, como los presentados por los pacientes P24 y P25 con 6.5% y 6.6% respectivamente. Finalmente el paciente P26, presenta valores de HbA1C de 6.2%, que corresponde al rango de los pacientes pre diabéticos.

6.1.4 Otros parámetros: IMC, Colesterol y triglicéridos.

Parámetros tales como Colesterol, triglicéridos e índice de masa corporal fueron tenidos en cuenta para el análisis de los pacientes sanos y diabéticos recientemente diagnosticados.

En la norma oficial Mexicana (NOM-015-SSA2, 2010), el Índice de Masa Corporal o índice de Quetelet, se define como el peso corporal en kilogramos, dividido entre la estatura en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2). Se habla de peso normal, si el $\text{IMC} \geq 18.5$ y < 24.9 , sobrepeso si $\text{IMC} \geq 25$ y < 29.9 , y obesidad si el $\text{IMC} \geq 30$.

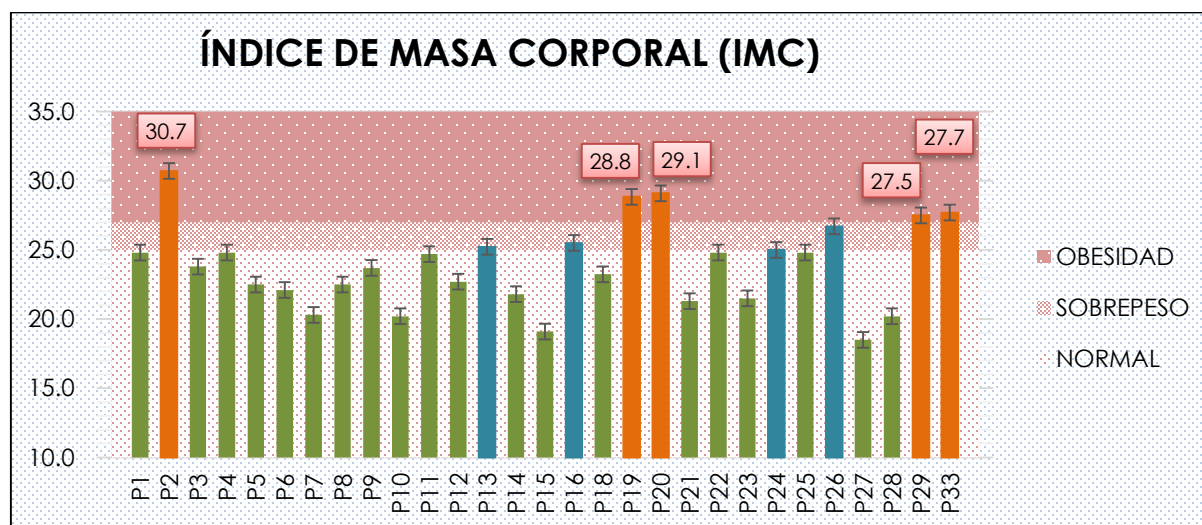


Figura 6. 4: Índice de masa corporal de la población. Obesidad (naranja), sobrepeso (azul), normal (verde).

En la figura 6.4, se puede observar los pacientes P2, P19, P20, P29 y P33 (barras en naranja) presentaron obesidad. Siendo estos pacientes "sanos", no se observó otra alteración, en las demás pruebas de caracterización. Los P13, P16, P24 Y P26 (barras en azul) presentaron sobrepeso, siendo el P24 y P26 pacientes diagnosticados con diabetes.

Las pruebas de triglicéridos (figura 6.5) y colesterol total (figura 6.6) fueron tomadas en ayuno de ambas poblaciones. El colesterol total incluyó las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los datos de referencia del estudio se basaron en la norma Mexicana oficial Mexicana (NOM-037-SSA2, 2002) "Para La Prevención, Tratamiento y Control de Las Dislipidemias".

La norma oficial (NOM-037-SSA2, 2002), establece que niveles ≥ 200 mg/dL son suficientes para el diagnóstico de enfermedad de triglicéridos. En la figura 6.5, los pacientes P5, P19, P25 y P26 (barras en naranja), estuvieron en el rango indicativo de enfermedad por triglicéridos con niveles de 209, 230, 253 y 302 mg/dL respectivamente. Cabe destacar que los 2 pacientes con valores más elevados de triglicéridos (P25 y P26), pertenecen al grupo de pacientes diagnosticados con diabetes. No obstante lo anterior, 2 pacientes pertenecientes a la población sana (P5 y P19) también superaron el umbral. Estos pacientes fueron tenidos en la prueba de aliento ya que no presentaron anomalías en las demás pruebas.

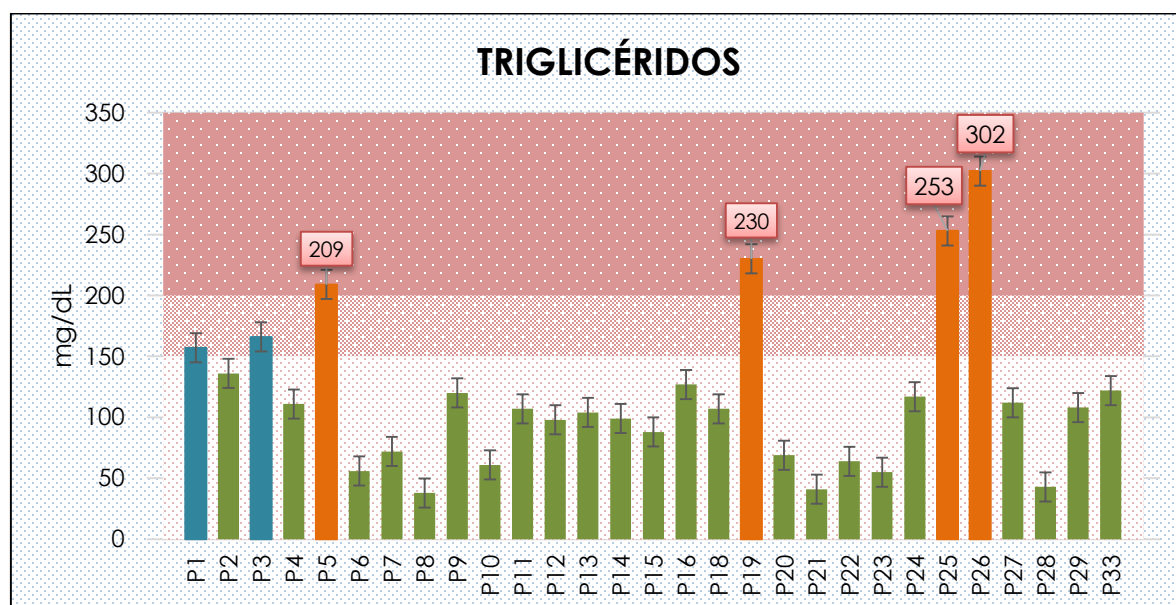


Figura 6. 5: Trigliceridos población de estudio. Límite de referencia 200 mg/dL (tabla 5.2).

Los pacientes P1 y P3 presentaron niveles irregulares para prueba, ya que estuvieron en el rango ≥ 150 mg/dL y < 200 mg/dL de lo establecido en la norma.

En la figura 6.5, el único paciente, P26 (barra en naranja) presentó un elevado nivel de colesterol de 293 mg/dL. Según (NOM-037-SSA2, 2002) para *La prevención, tratamiento y control de las dislipidemias*, se considera una persona enferma de colesterol, cuando los niveles superan 240 mg/dL. Cabe destacar que el paciente P26 fue diagnosticado con diabetes, presentando el mayor nivel de glucosa promedio en el grupo de diabéticos con reciente diagnóstico.

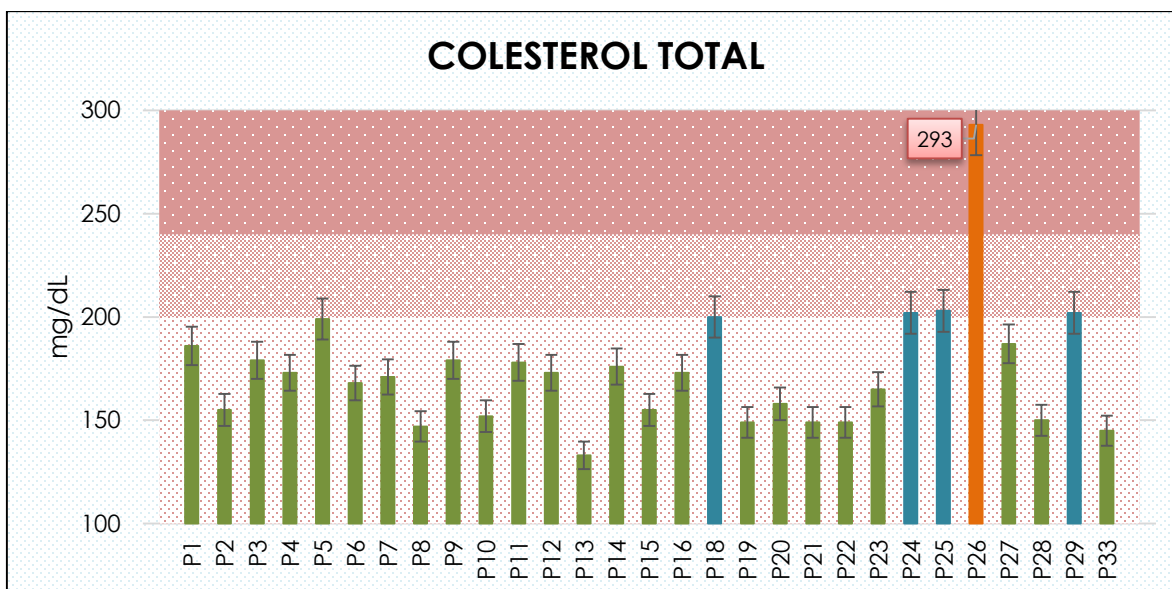


Figura 6. 6: Niveles de Colesterol total de la población. Pacientes normales (verde), Colesterol irregular (azul), Colesterol alto (naranja).

Bajo los criterios de la (NOM-037-SSA2, 2002), los niveles irregulares de colesterol se establecen en un rango ≥ 200 mg/dL y ≤ 239 mg/dL. De esta forma, los pacientes P18, P24, P25 y P29 (barras en azul), presentaron niveles irregulares en el colesterol, con valores de 200, 202, 203 y 202 mg/dL respectivamente.

6.2 Metabolitos presentes en el aliento

Se encontró un total de 92 compuestos orgánicos presentes en el aliento de pacientes sanos y diabéticos (tabla 6.3). En la figura 6.7, se muestra un cromatograma con una muestra de aliento de un paciente sano (azul), un paciente de reciente diagnóstico de diabetes (negro), y un paciente con diabetes en estado crítico (rojo). Posteriormente realizó un diagrama de barras en escala logarítmica para observar las diferencias en la abundancia promedio de los compuestos en el aliento de los pacientes sanos y diabéticos (figura 6.8).

COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL ALIENTO		
Propano	3 Metil Butanal	Etilbenceno
Isobutano	3 Metil 2 Butanona	2,4 Dimetil Heptanol
Acetaldehído	Butanol	O-Xileno
Metanol	3 Metil 2 Butenal	3 Etil Heptano
Butano	Benceno	2,4,6 Trimetilheptano
Etanol	Ciclohexano	2,2 Dimetil Heptano
2-Propenal	2 Pentanona	2,2 Dimetil Octano
Acetona	2,3 Dimetilpentano	P-Xileno
Alcohol Isopropílico	3 Metil Hexano	Nonano
Pentano	Alilmetil Sulfuro	3,3 Dimetil Octano
Isopreno	1 Hepteno	4 Etil 2 Metil Hexano
2 Metil Propanol	2,2,3,3 Tetrametil Butano	3,3 Dietil Pentano
Disulfuro De Carbono	Ácido Acético Propil Ester	2,2,6 Trimetil Octano
2,2 Dimetil Butano	Heptano	Tetrametilciclopentano
2 Metil Propanal	2 Etoxi Etanol	Benzaldehído
Propanonitrilo	Pirimidina	Decano
Propanol	Butenona	Clopidol
Metacroleína(Isobutenal)	Metil Ciclohexano	2,2,3,4 Tetrametil Pentano
Éter Metil Terbutílico (MTBE)	2, 5 Dimetil Hexano	m-Etil Tolueno
2 Metilpentano	2,3 Dimetil Ciclohexanol	2,3,3 Trimetil Octano
Butanal	Pentanol	2 Etil 1 Hexanol
2 Butanona (Metilacetona)	2, 3 ,4 Trimetil Pentano	1,4 Dicloro Benceno
3 Metil Pentano	Tolueno	2,6 Dimetil Decano
1 Hexeno	2 Hexanona	2,2,4,6,6 Pentametil Heptano
2 Metil Furano	3,4,5 Trimetil Heptano	Limoneno
Hexano	Hexanal	3,3 Dimetil Hexano
Triclorometano (Cloroformo)	Octeno	2,4,6 Trimetil Decano
Isobutanol	Octano	5 Etil 2,2,3 Trimetil Heptano
Tetrahidrofurano	2,3,5 Trimetilhexano	Nonanal
2,2 Dimetilpentano	4 Metil Octano	Undecano
Metil Ciclopentano	Metil Ciclo octano	

Tabla 6. 3: Compuestos encontrados en el aliento de los pacientes del presente estudio.

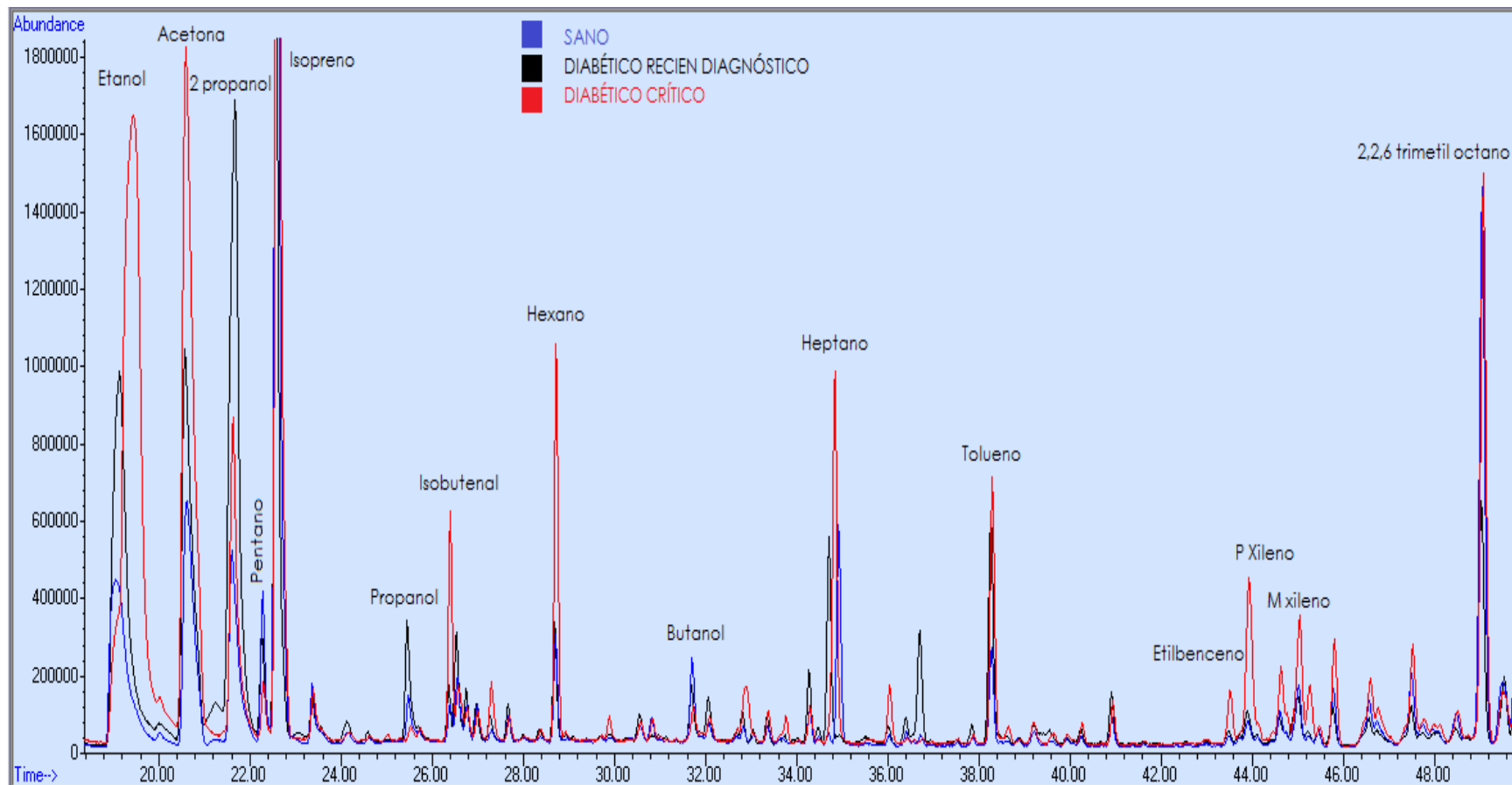


Figura 6. 7: Cromatograma muestra de aliento. Azul: paciente sano, negro: paciente recientemente diagnosticado con diabetes, rojo: diabético en estado crítico.

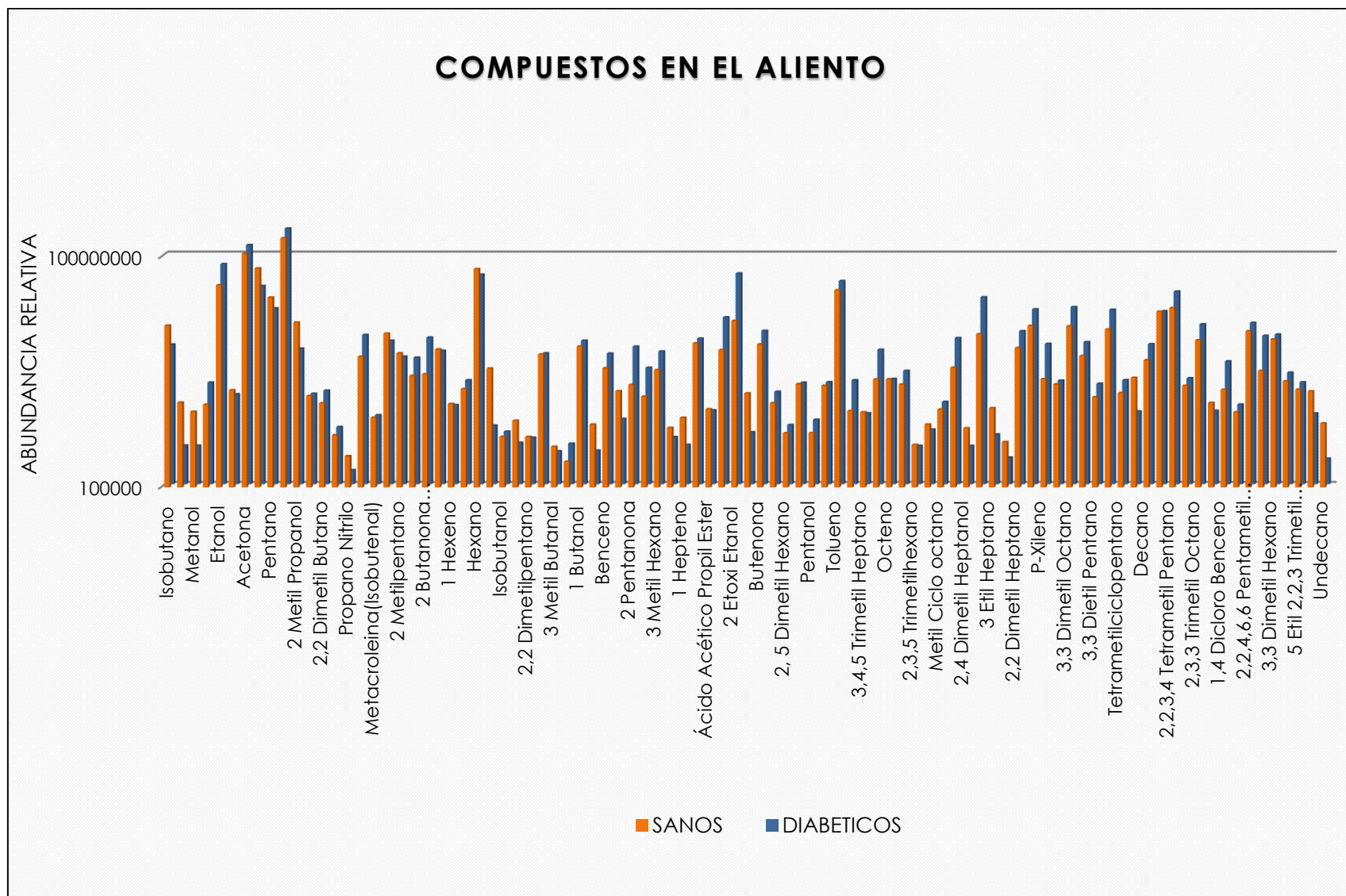


Figura 6. 8: Compuestos y abundancias en el aliento de pacientes sanos y diabéticos.

Para los compuestos presentes en el aliento, se encontró que el coeficiente de variación intra-individual fue $33.2 \pm 6.4\%$, mientras que el coeficiente de variación inter-individual fue de $107.8 \pm 39.2\%$, cabe destacar que en este último no se tuvieron en cuenta parámetros fisiológicos de los pacientes.

Un biomarcador de gran importancia es la acetona, y ha sido el más estudiado en relación con la diabetes (C. Wang et al. 2010). La acetona presentó una variación intra-individual de $18.94 \pm 6.4\%$. Para analizar la relación de la acetona con los niveles de glucosa, se graficó (Figura 6.9) el área bajo la curva de acetona de cada paciente y los niveles de glucosa promedio de pacientes sanos, diabéticos en estado crítico y de reciente diagnóstico

La figura 6.9 puede dividirse en dos sectores, antes del paciente P20 los datos de glucosa promedio y acetona no fluctúan fuertemente, y por el contrario, después del paciente P20 los datos presentan cambios más apreciables.

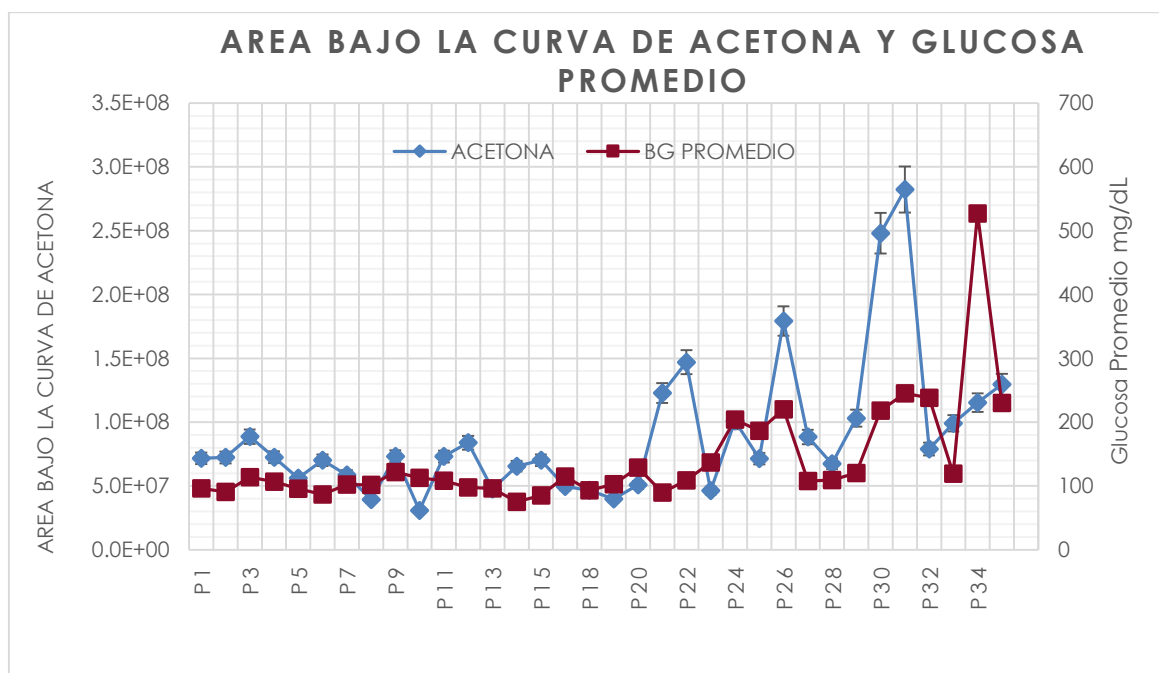


Figura 6. 9: Área bajo la curva de acetona y glucosa promedio en sangre de cada paciente.

En la figura 6.9, desde el paciente P23 hasta el paciente P31, las curvas presentan un patrón de comportamiento similar. No obstante es apreciable que los niveles de acetona no concuerdan con los datos de BG de los pacientes P21 y P22.

6.3 Determinación de la línea basal

La línea basal de la población sana se determinó con base al criterio del error estándar. El error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$) estima la variabilidad entre las muestras de cada población de pacientes para cada metabolito (figura 6.14). El error estándar se obtuvo mediante la ecuación 6.1, donde S es la desviación estándar del compuesto en las muestra de una población de pacientes (sanos o diabéticos) y N es el número de pacientes de la población, independiente de las repeticiones.

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Ecuación 6. 1: error estándar de las poblaciones.

Los compuestos que representaron la línea basal (figura 6.10), fueron aquellos en los cuales el error estándar de 27 pacientes sanos, difirió del rango del error estándar de los 8 pacientes con diabetes.

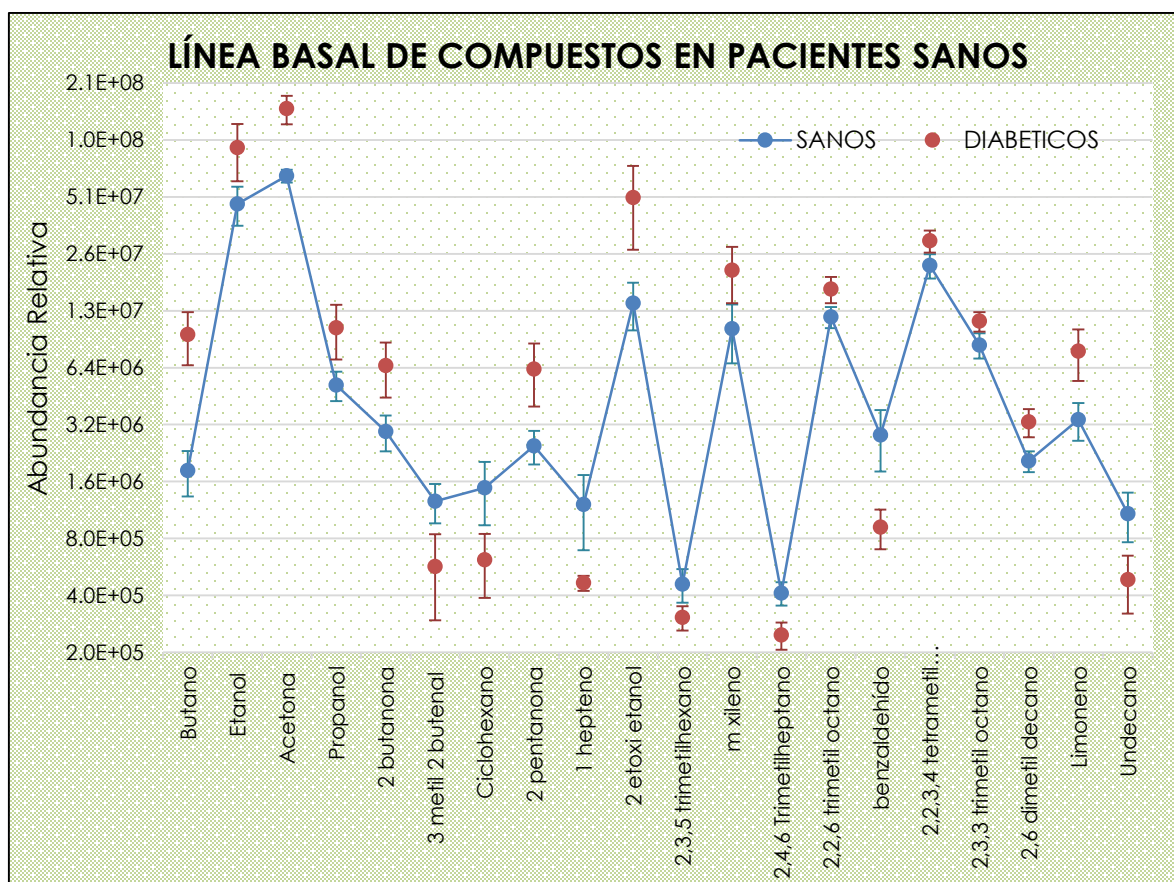


Figura 6. 10: Lineal basal de metabolitos presentes en el aliento exhalado.

En la figura 6.10, se puede observar el promedio de las abundancias relativas en escala logarítmica de los compuestos en el aliento. En línea azul se representan los pacientes sanos y sus respectivos errores estándar y en puntos rojos los pacientes diabéticos y los errores estándar encontrados.

De los 92 compuestos presentes en el aliento, solo 20 mostraron diferencias considerables cuando se tiene en cuenta el error estándar de ambas poblaciones. De esta forma los compuestos que definieron la línea basal de la población sana fueron:

- Butano
- Etanol
- Acetona
- Propanol
- 2 Butanona
- 3 metil 2 butenal
- Ciclohexano
- 2 Pentanona
- 1 Hepteno
- 2 Etoxi etanol
- 2,3,5 trimetil hexano
- m- xileno
- 2,4,6 trimetil heptano
- 2,2,6 trimetil octano
- Benzaldehído
- 2,2,3 Tetrametil pentano
- 2,3,3 trimetil octano
- 2,6 dimetil decano
- Limoneno
- Undecano

6.4 Análisis de componentes principales (PCA)

En el análisis de componentes principales (tabla 6.4) de los compuestos, los valores propios de los dos primeros componentes $PC1 = 36.77$ y $PC2 = 7.97$, estuvieron por encima del promedio de todos los valores propios. No obstante las dos componentes principales explicaron el 48% de la varianza total de los datos.

PCA. Eigenvalores y sus contribuciones a las correlaciones				
	PC1	PC2	PC3	PC4
Eigenvalor	36.7715	7.97318	6.92447	4.13765
Proporción explicada	0.3997	0.08667	0.07527	0.04497
Proporción Acumulada	0.3997	0.48636	0.56162	0.6066

Tabla 6. 4: Análisis de componentes principales de metabolitos en el aliento.

Las dos componentes principales fueron asociadas: en PC1 al 3 metil hexano y en PC2 a la 2 hexanona, llamada también MBK por sus siglas en inglés “methyl butyl ketone”. El 3 metil hexano ha sido estudiado como un biomarcador de múltiples enfermedades, como desordenes metabólicos (H. Günther et al. 2008), enfermedades hepáticas crónicas en niños (K. Eng et al. 2015), entre otras. El MBK ó 2 hexanona ha sido estudiada por estar presente en el aliento el aliento de algunos niños con diabetes tipo 1 (S. Stevens. 2013).

Cabe destacar que el MBK esta relacionado con el catabolismo de la isoleucina (A. Amann. 2005), la isoleucina es necesaria para la restauración del tejido muscular, así como para el funcionamiento del hígado y el cerebro, esta no puede ser sintetizar en el organismo. Por lo anterior, debe ser aportada por los alimentos como la leche, quesos, huevo y carne, siendo degradada principalmente en el músculo.

En la figura 6.11, el análisis de componentes principales en el plano de las correlaciones, se puede observar cada compuesto como un vector y su respectiva distribución en los en los 4 cuadrantes. La ordenación de compuestos presentó mayor tendencia al PCA eje 1 positivo, de esta forma se puede observar que el vector C40 (3 metil hexano) en el cuadrante inferior derecho, presenta una mayor magnitud, siendo la componente principal asociada al eje uno. También es posible observar que C55 (2 hexanona), también en el cuadrante inferior derecho presenta una magnitud sobresaliente, estando más orientado hacia el segundo eje, componente principal 2.

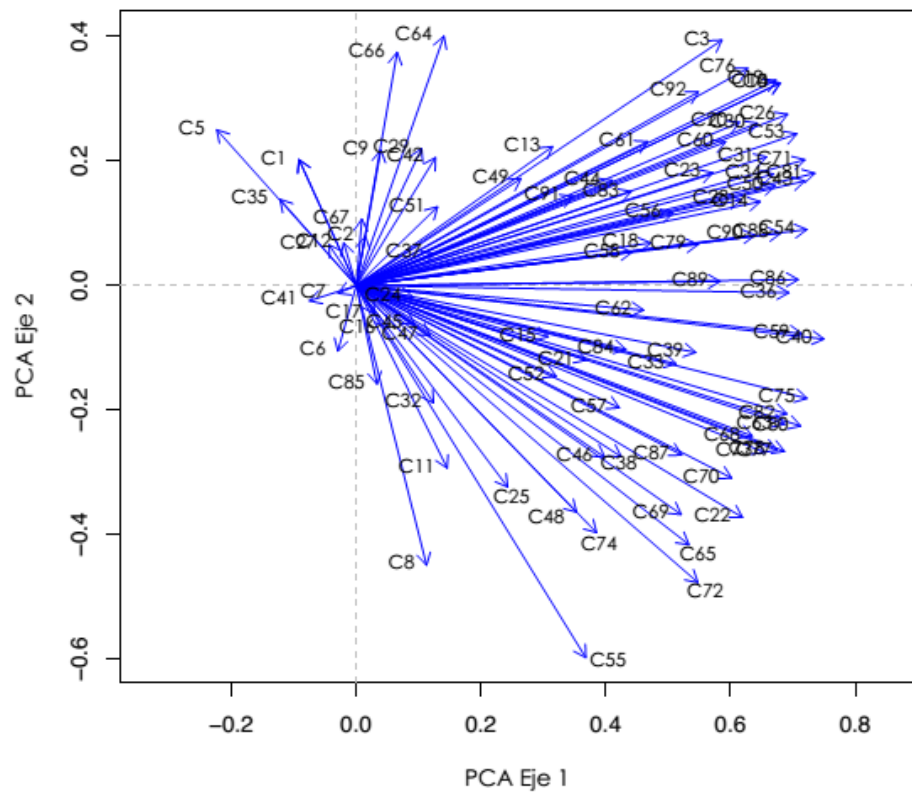


Figura 6. 11: Analisis de componentes principales, plano de las correlaciones de 92 metabolitos.

En la ordenación de los 35 pacientes en plano de las distancias del PCA (figura 6.12), se puede observar claramente 2 agrupaciones. Los pacientes sanos (puntos en azul), la mayoría se agruparon en el cuadrante superior izquierdo (elipse azul). Los pacientes en estado crítico de diabetes (puntos morados) en el cuadrante inferior derecho (elipse morada).

De los tres pacientes recientemente diagnosticados con diabetes, P24, P25 y P26 (puntos en naranja), solo 1 se posicionó en el cuadrante inferior derecho, y los dos restantes se ubicaron en el cuadrante superior izquierdo, dentro de la población sana.

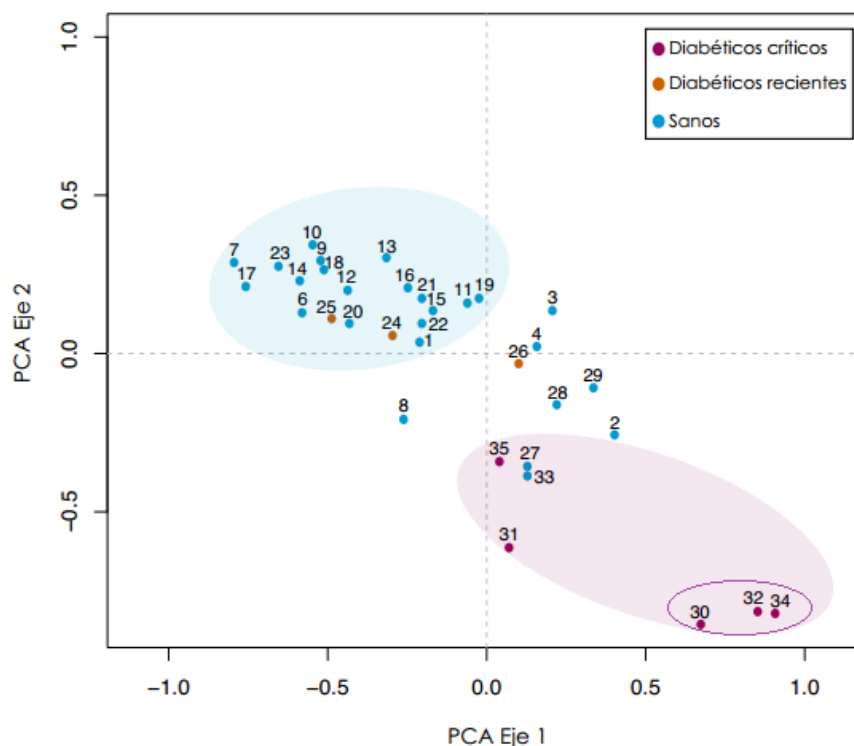


Figura 6. 12: Analisis de componentes principales en el plano de las distancias entre pacientes.

En el plano de las distancia del PCA, también se puede observar cinco pacientes sanos P2 P27 P28 P29 y P33 que estuvieron presentes en el cuadrante inferior derecho, y dos de estos en la agrupación de pacientes con diabetes en estado crítico. Los pacientes P3, P4 y P8 estuvieron en los dos cuadrantes restantes, sin presentar un agrupamiento apreciable.

En el extremo inferior derecho, se marcó una gran diferencia de la población de pacientes en estado crítico de diabetes. P30, P32 y P34, mostraron puntuaciones de 1.07454, 1.36147 y 1.44449 respectivamente en sus correlaciones.

Dado que el cuadrante inferior derecho presentó la mayor relación con los pacientes diabéticos, se optó por analizar los compuestos de este cuadrante y algunos compuestos que son biomarcadores de la diabetes (figura 6.13).

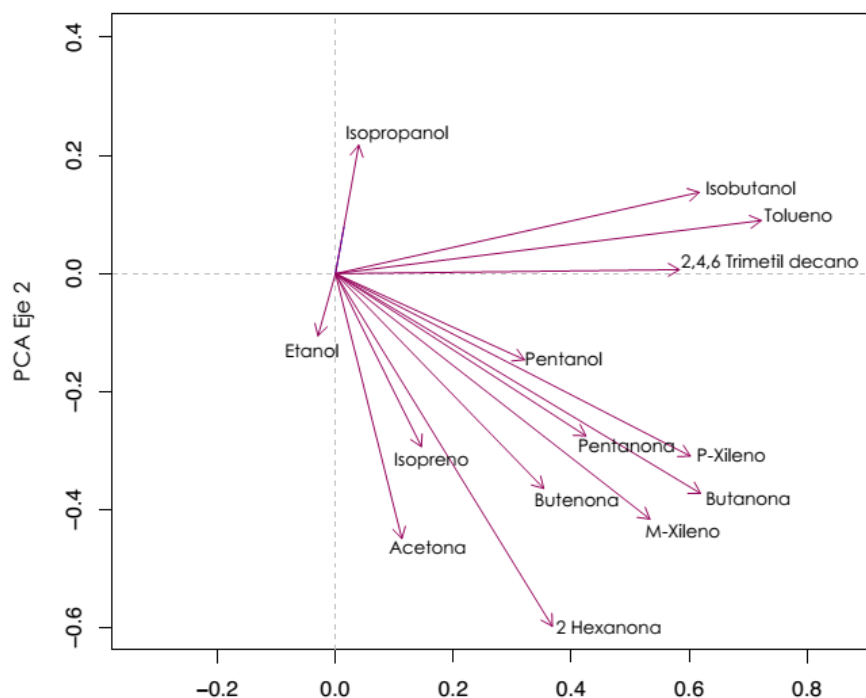


Figura 6. 13: Analisis de componentes principales, plano de las correlaciones de metabolitos asociados a la diabetes.

En el análisis de compuestos en el aliento de pacientes diabéticos, la acetona ha sido el biomarcador más estudiado. No obstante también se han analizado otros biomarcadores de diabetes como el isopropanol, tolueno, m/p Xileno, 2, 6, 8 trimetildecano (Y. Yan Q, et al. 2014), etanol, isopreno, pentanol, pentanona, butanona, butenona (Anton Amann D., 2013). Con el análisis del PCA se pudo corroborar la relación de nueve de estos biomarcadores con la diabetes, y posteriormente se observó la diferencia de cada uno de estos con los pacientes sanos (figura 6.14).

En el diagrama de bigotes (figura 6.14), se puede observar que la 2 hexanona estuvo mayormente diferenciada entre las poblaciones, aunque presentó valores atípicos u observaciones remotas, los máximos y mínimos de los datos típicos jamás se interceptaron.

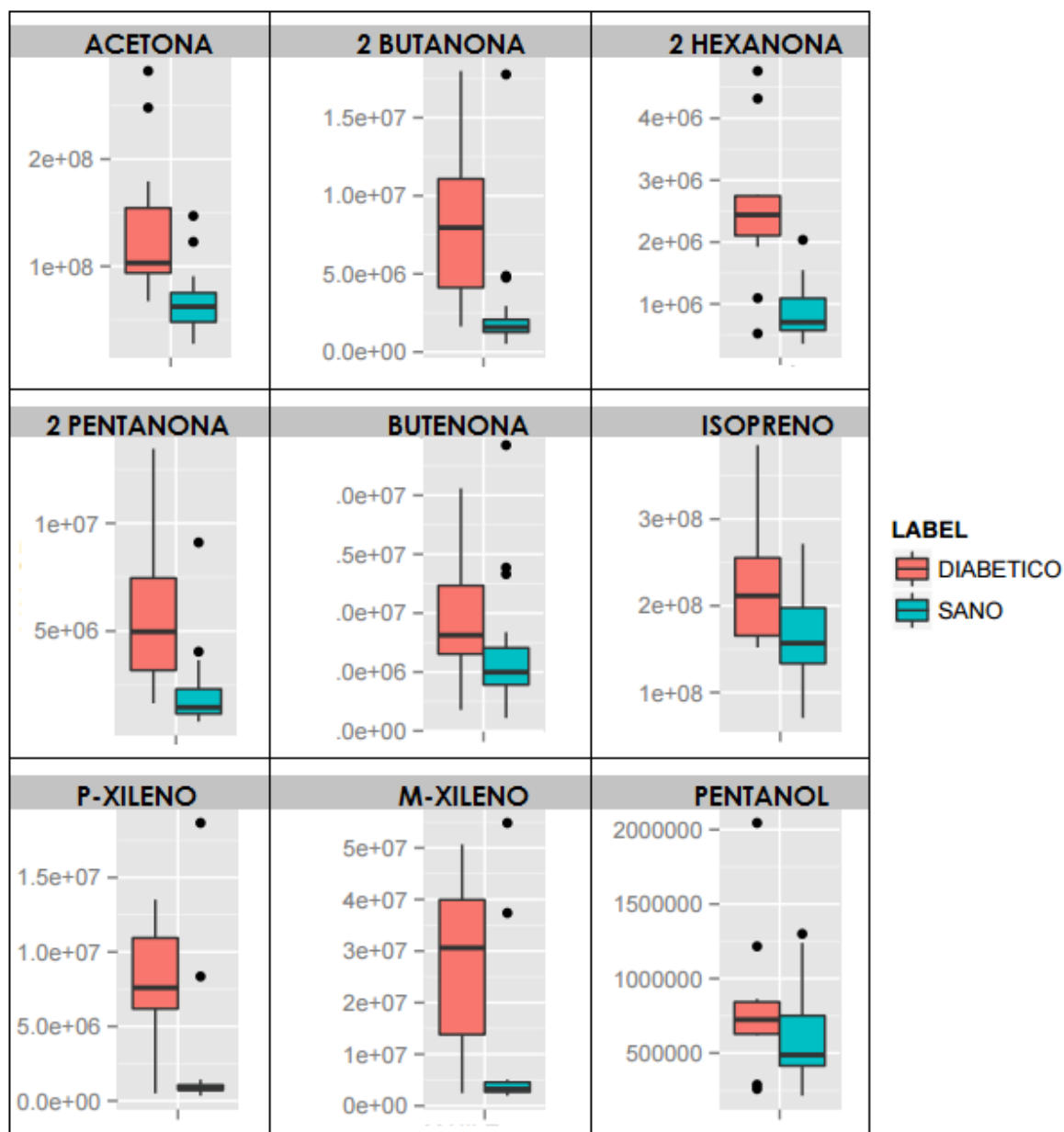


Figura 6. 14: Diagrama de bigotes de biomarcadores de diabetes en el aliento de personas sanas y diabéticas.

En la figura 6.14, la Acetona, 2 Butanona, 2 Pentanona, y p/m Xileno también estuvieron diferenciados en ambas poblaciones, de esta forma la mediana, percentil 25 y percentil 75 tampoco se interceptaron en sus abundancias, aunque los valores máximos y mínimos típicos presentaron solapamiento en las abundancias. La Butenona, isopreno y Pentanol convergieron en el percentil 25 de pacientes diabéticos y percentil 75 de pacientes sanos.

CAPITULO 7: CONCLUSIONES

El análisis de compuestos en el aliento es una técnica no invasiva y prometedora para el diagnóstico oportuno y monitoreo de múltiples patologías. No obstante el análisis de metabolitos en aliento requiere la estandarización de protocolos de toma de muestras de aliento así como estudios focalizados a sectores étnicos y geográficos específicos. Es necesario llevar un control eficiente de las variables que puedan afectar las medidas, así como también una selección clara del volumen a muestrear. Para analizar el aire alveolar en los pacientes, es primordial eliminar el aire del espacio muerto anatómico de los pacientes, que bajo condiciones corporales es aproximadamente 200 mL.

Para analizar las muestras de aliento es necesario implementar un sistema de muestreo, que permita capturar las muestras y conservarlas para su posterior análisis por cromatografía de gases. Seguidamente la identificación y cuantificación de los metabolitos debe ser correlacionada con variables fisiológicas, que permitan determinar variaciones de las poblaciones.

En este proyecto se analizaron los compuestos presentes en el aliento de 27 pacientes sanos, 3 pacientes recientemente diagnosticados con diabetes y 5 pacientes en estado crítico de esta misma patología. Mediante el análisis de cromatografía de gases con espectrometría de masas, se encontró un total de 92 compuestos en el aliento exhalado. De éstos, y mediante la cuantificación indirecta presentaron un coeficiente de variación intra-individual e inter-individual de $33.2 \pm 6.4\%$ y $107.8 \pm 39.2\%$ respectivamente.

Se determinó, basado en estos estudios la línea basal de compuestos presentes en la población sana. Para esto solo se tuvieron en cuenta los compuestos que presentaron diferencias significativas en sus promedios, y que no entrecruzaban los errores estándar de ambas poblaciones. Del total de metabolitos presentes en el aliento, 20 de estos permitieron determinar la línea basal: Butano, Etanol, Acetona, Propanol, 2 Butanona, 3 metil 2 butenal, Ciclohexano, 2 Pentanona, 1 Hepteno, 2 Etoxi etanol, 2,3,5 trimetil hexano, m- xileno, 2,4,6 trimetil

heptano, 2,2,6 trimetil octano, Benzaldehído, 2,2,3 Tetrametil pentano, 2,3,3 trimetil octano, 2,6 dimetil decano, Limoneno y Undecano.

El análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos encontrados en el aliento, permitió observar una clara diferencia en agrupaciones de pacientes sanos y pacientes con diabetes en estado crítico. Así mismo se pudo corroborar la relación de 9 metabolitos con la patología diabética: Acetona, Isopreno, 2 hexanona, Butanona, Butenona, m-Xileno, p-xileno, Pentanol y Pentanona.

8. BIBLIOGRAFIA

A. Garrido, R. Olmo, C. Castel, C. Teijón. (2001). *Bioquímica metabólica*. Tebar.

- A. Macagnano, E. Martinelli. (2003). Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Elsevier, Biosensors and Bioelectronics*, Volume 18, 1209–1218.
- ADA. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1183-1197.
- ADA. (2015). Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes. *American Diabetes Association*.
- Anton Amann, D. S. (2005). *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring*. London: World Scientific.
- Anton Amann, D. S. (2013). *Volatile biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*. Amsterdam, the Netherlands: ELSEVIER.
- Anton Amann, W. M. (2014). Analysis of Exhaled Breath for Disease Detection. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 7: 455-482.
- Baden, U. o. (2015). Measurements of Organic Compounds using Mass Spectrometry, Proton-Transfer-Reaction-Mass Spectrometer (PTR-MS) onboard aircraft. *Karlsruhe Institute of technology*.
- C. Pinheiro, M. Rodríguez, G. Schäfer . (2002). Monitoring the Aroma Production during Wine-Must Fermentation with an Electronic Nose. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 77, 632-640.
- C. Wang, P. Sahay. (2009). Breath Analysis Using Laser Spectroscopic Techniques: Breath Biomarkers, Spectral Fingerprints, and Detection Limits. *Sensors Vol.9*, 8230-8262.
- C. Wang, A. Mbi & M. Shepherd. (2010). A Study on Breath Acetone in Diabetic Patients Using a Cavity Ringdown Breath Analyzer: Exploring Correlations of Breath Acetone With Blood Glucose and Glycohemoglobin A1C. *IEEE SENSORS JOURNAL*, 54-63.

Chuji Wang, Armstrong Mbi, and Mark Shepherd. (2010). A Study on Breath Acetone in Diabetic Patients Using a Cavity Ringdown Breath Analyzer: Exploring Correlations of Breath Acetone With Blood Glucose and Glycohemoglobin A1C. *IEEE SENSORS JOURNAL*, 54-63.

CSIC, C. S. (2011). *Conceptos fundamentales de Cromatografía*. Madrid, España.

David L. Nelson, M. M. (2009.). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman 5e.

Delgado, M. (2012). *Bioquímica Estructural y Metabólica, universidad de Cantabria, Ciencias de salud*. España.

Diazaraque, J. M. (2006). *Tema 3: Análisis de Componentes*. Madrid España: Universidad Carlos III de Madrid.

E. Holthoff, J. B. (2010). Modern IR diode lasers enable novel photoacoustic sensors. *international society for optics and photonics*.

ENSANUT. (2012). Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*.

Espinosa, M. (2014). *SISTEMA GLANDULAR*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.

Federation, I. D. (2012). International DiabeThe IDF Diabetes Atlas. *NATURE*, VOL 485.

G. Berden, R. P. (2000). Cavity ring-down spectroscopy: Experimental schemes and applications. *International Reviews in Physical Chemistry*, 565–607.

Gong ZY, .. S. (2014). A Ringdown Breath Acetone Analyzer: Performance and Validation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical & Bioanalytical Techniques*.

Gurrea, M. T. (2001). *ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES*. Universidad Abierta de Cataluña.

- H. Huang, J. Zhou, S. Chen, Lei Zeng. (2004). A highly sensitive QCM sensor coated with Ag+-ZSM-5 film for medical diagnosis. *ELSEVIER. Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 101, Pages 316–321.
- Hans Günther Wahl, A. C. (2008). *Breath Analysis from Patients with Metabolic Disorders: GC-MS Analysis with a Combined Thermodesorption - Cooled Injection System*. Mülheim an der Ruhr, Germany: Gerstel GmbH & Co.KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1.
- Hopkins, U. J. (1995). Deadspace. *Respiratory Physiology*.
- Huelva, U. d. (2009). Anatomía y fisiología . *Enfermería y Diabetes*.
- I. Moreno, R. Caballero. (2009). La Nariz Electrónica: Estado del Arte . *Elsevier*, 76-91.
- J. Gawłowski, T. G. (2000). *Dry purge for the removal of water from the solid sorbents used to sample volatile organic compounds from the atmospheric air*. *Analyst*.
- J. López, E. D. (2014). Pathogenesis of halitosis. Review. *Scientific Electronic Library Online (SCIELO)*.
- J. Wojtas, Z. B. (2012). Ultrasensitive Laser Spectroscopy for breath analysis. *VERSITA Opto- Electronics* 20, 26-39.
- K. Kim, S. J. (2012). A review of breath analysis. *Trends in Analytical Chemistry*.
- K. Persaud, G. Dodd . (1982). Analysis of discrimination mechanisms of the mammalian olfactory system a model nose. *Nature*, Volume 299, 352-355. .
- Katharine Eng, N. A. (2015). Analysis of breath volatile organic compounds in children with chronic liver disease compared to healthy controls. *Journal of Breath Research*, Volume 9, Number 2.
- L. Olguín, H. R. (2004). *MÉTODOS EN BIOTECNOLOGÍA, CROMATOGRÁFIA DE GASES*. *Universidad Nacional Autónoma de México*.

- L. Pauling, A. R. (1971). Quantitative Analysis of urine vapor and breath by Gas-Liquid partition Chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 68, 2374-2376.
- López, P. S. (2012). *EXCRECIÓN Y ELIMINACIÓN DE XENOBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS*. Madrid, España: Universidad de Alcalá.
- M.L López. (2009). Sensores Químicos. *Universidad Nacional de Córdoba*, 8-32.
- McManus. (2013). Energía química del organismo. *Naturalmente Ciencias*.
- NOM-015-SSA2. (2010). Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Norma Oficial Mexicana*.
- NOM-037-SSA2. (2002). PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LAS DISLIPIDEMIAS. *Norma Oficial Mexicana*.
- Phillips M, H. J. (1999). Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *Journal of Chromatography*, 729(1-2): 75-88.
- Porto, A. (2010). *METABOLISMO: ASPECTOS GENERALES*. Departamento de Biología-Geología, IES María Casares.
- PUC, P. U. (2008). Diabetes Mellitus. *Nutrición*.
- RISBY, T. (2005). CURRENT STATUS OF CLINICAL BREATH ANALYSIS. *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring*, 251.
- S Stevens, C. G.-S. (2013). A study of volatile compounds in the breath of children with type 1 diabetes. *arXiv preprint arXiv:1303.4210*.
- Scully, T. (2012). Diabetes in numbers. *Nature* 485.
- Silverthorn, D. U. (2008). *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. 4a edición.
- SISIB. (2013). Apuntes química analítica e instrumental: Electroquímica. *Biblioteca digital Universidad de Chile*, Cap 22-25.

TO-17, C. f. (1999). Compendium Method TO-17: Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compound in Ambient Air. *Environmental Protection Agency U.S.*

UJAEN, U. d. (2006). *Técnicas cromatográficas*. Madrid.

W. Lindinger, A. H. (1998). On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.*, 191-241.

Wisse, B. (2014). Examen de A1C. *MedlinePlus*.

Yagües, V. (2008). *CROMATOGRAFÍA: PRINCIPIOS GENERALES*. España: Universidad de Alicante.

Yanyue Yan, Q. W. (2014). Discovery of potential biomarkers in exhaled breath for diagnosis of type 2 diabetes mellitus based on GC-MS with metabolomics. *Royal Society of Chemistry*.

Yanyue Yan, Q. W. (2014). Discovery of potential biomarkers in exhaled breath for diagnosis of type 2 diabetes mellitus based on GC-MS with metabolomics. *The Royal Society of Chemistry*, 25430-25439.

ANEXOS

PLANTILLA DE DATOS PERSONALES Y ANTECEDENTES

Instrucciones: Llenar los espacios en blanco de siguiente tabla con la información que se requiere en el apartado I y II. El personal técnico se encargará de llenar el apartado III y IV.

I. DATOS DE VOLUNTARIOS, PRUEBA DE METABOLITOS PRESENTES EN EL ALIENTO					
NOMBRE					
TELÉFONO					
OCUPACIÓN					
FOLIO (HGM)		FOLIO CCA			
EDAD		SEXO			
PESO		ESTATURA			
IMC		FUMA			
MEDICAMENTOS USUALES					
II. ANTECEDENTES FAMILIARES (ESCRIBIR CUÁNTOS FAMILIARES PADECEN)					
PARENTESCO	NUMERO	DIABETES	OBESIDAD	COLESTEROL	
MADRE	1				
PADRE	1				
ABUELOS	4				
HERMANOS					
TIOS					
III. PRUEBAS HEMATOLÓGICAS					
GLUCOSA EN SANGRE (BG) AYUNO					
GLUCOSA EN SANGRE (BG) PROMEDIO					
HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (A1C)					
COLESTEROL TOTAL					
IV. FECHAS TOMAS DE ALIENTO					
PRIMERA MUESTRA (PM):	SEGUNDA MUESTRA (SM):	TERCERA MUESTRA (TM):			
V. DATOS TÉCNICOS TOMA DE MUESTRA					
TEMPERATURA °C	PM:	PRESIÓN mmHg	PM:	%HUMEDAD REL.	PM:
	SM:		SM:		SM:

Tabla 9. 1 Plantilla pacientes, datos personales y antecedentes familiares.

EVALUACIÓN LIMPIEZA DE BOLSAS TEDLAR

Como se comentó en el apartado 5.3.5 del capítulo de métodos cada bolsa tedlar fue reutilizada una vez. Para asegurar que este procedimiento no inducía efectos sistemáticos se realizó un protocolo de limpieza (capítulo 5.3.5). Este consistió en llevar a cabo dos lavados con aire cero durante 3 minutos seguido de calentamiento a 90°C. Finalmente un último lavado con nitrógeno gaseoso durante 3 minutos y 15 minutos de calentamiento a 90°C.

Para evaluar el método de limpieza, se llenaron con nitrógeno gaseoso dos bolsas "sucias" donde previamente se había tomado una muestra de aliento. Posteriormente se pasaron las muestras a tubos multilecho, el cual fue analizado mediante CG-SM bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras comunes de aliento.

En la figura 11.1 se puede observar el cromatograma en azul una bolsa sucia, y en negro una bolsa que fue acondicionada bajo el protocolo de limpieza. El cromatograma muestra que el método de limpieza disminuye significativamente los compuestos remanente de las muestras de aliento.

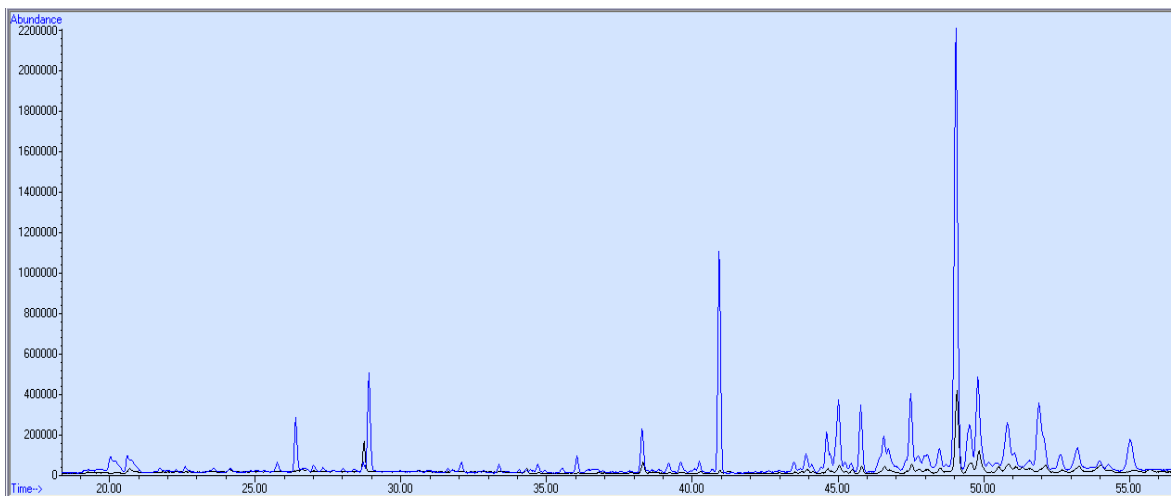


Figura 9. 1: Cromatograma: en azul, bolsa tedlar sucia (después de una toma de muestra de aliento), en negro bolsa tedlar después de limpieza.

Para evaluar y cuantificar la limpieza de las bolsas, se estudió el área total bajo la curva de los cromatogramas antes y después de la limpieza de las bolsas,

de esta forma se encontró que la limpieza total de las bolsas tedlar fue de $96.7 \pm 0.4 \%$.

No obstante se encontró que hay algunos compuestos que presentan mayor dificultad para la eliminación de las bolsas, por ejemplo el hexano y el 2,2,6 trimetil octano, estos compuestos fueron removidos de las bolsas tedlar en un $84.3 \pm 0.5\%$ y $78.2 \pm 0.4\%$ respectivamente.

INDICE DE FÍGURAS, TABLAS Y ECUACIONES.

FIGURAS

Figura 2.1: Principales países con mayor número de personas diabéticas en el mundo (Federation, 2012).	10
Figura 3.1: Esquema General del metabolismo: anabolismo ó síntesis en azul y catabolismo ó degradación en rojo. (McManus, 2013)	15
Figura 3.2: Rutas metabólicas dentro de la célula (David L. Nelson, 2009.)	16
Figura 3.3: El aparato respiratorio: vías aéreas superior e inferior. (Silverthorn, 2008).	18
Figura 3.4: Vías aéreas: a) ramificación de las vías aéreas, b) Intercambio gaseoso en las vías aéreas (Silverthorn, 2008).	19
Figura 3.5: Regulación de glucemia mediante la emisión de insulina y glucagón (Huelva, 2009).	28
Figura 4.1: Esquema de Cromatografía de gases. Fuente: Instituto de química general, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.	33
Figura 4.2: Orden de elusión de los compuestos en el cromatógrafo.....	34
Figura 4.3: Métodos para la eliminación de vapor. a) tubo de Nafión. b) Purga en seco con tubos absorbentes.....	35
Figura 4.4: Esquema sonda sensible a gases análisis de dióxido de carbono (SISIB, 2013).....	37
Figura 4.5: La nariz electrónica y el sistema del olfato humano (C. Pinheiro, M. Rodríguez, G. Schäfer , 2002)	38
Figura 4.6: Esquema de Funcionamiento espectrometría por transferencia de protones (PTR-MS) (Baden, 2015).....	39
Figura 4.7: la absorción efectiva en la longitud de trayectoria, se incrementa más de 10.000 veces en la CRDS. Tiempo ringdown con y sin absorción (C. Wang, P. Sahay, 2009).....	42
Figura 4.8: Esquema de funcionamiento espectroscopía fotoacústica (E. Holthoff, 2010).....	43

Figura 5. 1 Tubos Multilecho. A) cartucho adsorbedor de VOC's. B) composición de los cartuchos.....	46
Figura 5.2: Tubo de Nafión que elimina la humedad del aliento.	47
Figura 5.3: Voluntarios de prueba de Curva de tolerancia de la glucosa.	49
Figura 5.4: Glucosa anhidra para prueba de tolerancia a la glucosa.....	49
Figura 5.5: Equipo de acondicionamiento de cartuchos absorbedores.	51
Figura 5.6: Toma de muestra de aliento: a) 300mL del espacio muerto, b) 1L de aire alveolar.....	52
Figura 5.7: Preconcentración de las muestras de aliento en cartuchos adsorbedores.	53
Figura 5.8: Cromatógrafo Agilent modelo 7890AGC. Recuadro interior termodesorción de la muestra.	54
Figura 5.9: Cromatograma típico de una muestra de aliento, abajo espectro de masas de un pico al tiempo 40.936 min. Software ChemStation.....	55
Figura 5.10: Calibración con estándares: a)Estándar gaseoso marca Spectra, b) KIT de estándares líquidos PolyScience.....	56
Figura 5.11: Integración de picos de compuestos. Software ChemStation.....	57
Figura 6.1: Glucosa promedio de pacientes. En verde pacientes sanos, azul diabéticos de reciente diagnostico y en negro pacientes en estado crítico de diabetes.....	61
Figura 6.2: Curva de tolerancia a la Glucosa. Valores de glicemia cada 30 min posterior a la ingestión de glucosa anhidra	62
Figura 6. 3: Hemoglobina glicosilada de la población. Azul pacientes recientemente diagnosticados, verde pacientes sanos. Límite de referencia 5.7 6.4% (tabla 5.2). 63	
Figura 6.4: Índice de masa corporal de la población. Obesidad (naranja), sobrepeso (azul), normal (verde).	64
Figura 6. 5: Trigliceridos población de estudio. Límite de referencia 200 mg/dL (tabla 5.2).....	65
Figura 6.6: Niveles de Colesterol total de la población. Pacientes normales (verde), Colesterol irregular (azul), Colesterol alto (naranja).	66

Figura 6.7: Cromatograma muestra de aliento. Azul: paciente sano, negro: paciente recientemente diagnosticado con diabetes, rojo: diabético en estado crítico.	68
Figura 6.8: Compuestos y abundancias en el aliento de pacientes sanos y diabéticos.	69
Figura 6. 9: Área bajo la curva de acetona y glucosa promedio en sangre de cada paciente.	70
Figura 6.10: Lineal basal de metabolitos presentes en el aliento exhalado.	71
Figura 6.11: Analisis de componentes principales, plano de las correlaciones de 92 metabolitos.	74
Figura 6.12: Analisis de componentes principales en el plano de las distancias entre pacientes.	75
Figura 6.13: Analisis de componentes principales, plano de las correlaciones de metabolitos asociados a la diabetes.	76
Figura 6.14: Diagrama de bigotes de biomarcadores de diabetes en el aliento de personas sanas y diabéticas.	77
Figura 9.1: Cromatograma: en azul, bolsa tedlar sucia (despues de una toma de muestra de aliento), en negro bolsa tedlar despues de limpieza.	86

TABLAS

Tabla 3.1: Volúmenes pulmonares en hombres y mujeres (Silverthorn, 2008)	21
Tabla 3.2: Compuestos orgánicos presentes en el aliento humano y relación con diversas patologías (C. Wang, P. Sahay, 2009).	23
Tabla 3.3: Concentraciones típicas de moléculas endógenas ó sistémicas en el aliento humano (RISBY, 2005).	25
Tabla 3.4: Principales compuestos más estudiados y desarrollados en pruebas clínicas de aliento.	25
Tabla 5. 1: Parámetros del cromatógrafo de gases	48
Tabla 5. 2: Parámetros de clasificación de pacientes según (NOM-015-SSA2, 2010). * (ADA, 2015) . ** (NOM-037-SSA2, 2002).	58

Tabla 6.1: Resumen datos fisiológicos de la población de estudio.	60
Tabla 6.2: Complicaciones pacientes en estado crítico de diabetes.....	62
Tabla 6.3: Compuestos encontrados en el aliento de los pacientes.....	67
Tabla 6.4: Análisis de componentes principales de metabolitos en el aliento.....	73
Tabla 9.1 Plantilla pacientes, datos personales y antecedentes familiares.....	85

ECUACIONES

Ecuación 4.1: Coeficiente termodinámico de reparto K.	34
Ecuación 4.2: Factor de Capacidad K'.....	35
Ecuación 4.3: Reacción de tranferencia de protones (PTR-MS).	39
Ecuación 4.4: Densidad de iones de VOC en PTR-MS.	40
Ecuación 4.5: Ley de Beer Lambert.	41
Ecuación 4.6: Absorbancia de moléculas de gas.....	41
Ecuación 4.7 Tiempo de caída ó tiempo ringdown en presencia de gas en la cavidad.....	42
Ecuación 4.8: Absorbancia de una molécula en espectroscopía Ringdown.	42
Ecuación 4.9: Límite de detección de una molécula en espectroscopía fotoacústica.....	44
Ecuación 6.1: error estándar de las poblaciones.....	71