



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

INVESTIGACIÓN DE METABOLITOS ASOCIADOS A LA PRE-DIABETES POR  
ANÁLISIS DE TRAZAS MOLECULARES EN EL ALIENTO EXHALADO

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

PRESENTA:  
KATYA PATRICIA VAZQUEZ RIVERA

TUTOR PRINCIPALES  
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 GUZMÁN – FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. (MES EN QUE SE REALIZÓ EL EXAMEN) 2017



# Universidad Nacional Autónoma de México

## **Título**

Investigación de metabolitos asociados a la pre-diabetes por análisis de trazas moleculares en el aliento exhalado

## **Estudiante**

Fis. Katya Patricia Vázquez Rivera

## **Director de Tesis**

Dr. Antonio Juárez Reyes

## **Miembros del Comité Tutoral**

Dr. Jesús Flores Mijangos

Dr. Rubén Fossión

Dra. Adriana Monroy (asesor profesional)

## **Colaboradores**

M. en C. José Manuel Hernández Solís (CCA, UNAM)

Dra. Yolanda Mares Gutiérrez (Dpto. Neumología, HGM)

M. en C. Ana María Gallegos Sánchez

# AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

---

# AGRADECIMIENTOS PERSONALES

---

# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.....	4
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	5
ÍNDICE.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	11
CAPITULO 2: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	14
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
2.2 HIPÓTESIS.....	15
2.3 JUSTIFICACIÓN.....	15
2.4 OBJETIVO GENERAL.....	16
2.5 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
CAPITULO 3: ANTECEDENTES.....	18
3.1 FUNDAMENTOS DEL METABOLISMO HUMANO.....	18
3.2 FUNDAMENTOS DE LA RESPIRACIÓN E INTERCAMBIO GASEOSO.....	20
3.3 VOLÚMENES DENTRO DEL CUERPO HUMANO Y EN CONDICIONES AMBIENTALES.....	22
3.4 PATOLOGÍAS DETECTABLES POR VOCs.....	23
3.5 PERSPECTIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES POR VOCS EN EL FUTURO.....	24
3.6 DIABETES.....	27
3.7 PREDIABETES.....	29
3.8 PROBLEMÁTICA DE LA DIABETES EN MEXICO Y EL MUNDO.....	30
3.9 VENTAJAS DE LA DETECCIÓN DE LA PREDIABETES.....	31
3.10 CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL COMO METODO DE DIAGNÓSTICO.....	32
3.11 ACTUALIDAD DE LAS INVESTIGACIONES EN DMT2.....	34
3.12 MÉTODO DE ANALISIS DE ALIENTO EXHALADO.....	35

3.13 LOS MÉTODOS ACTUALES PARA DETECCIÓN DE COVs .....	36
CAPITULO 4: METODOLOGÍA .....	38
4.1 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES.....	38
4.2 MUESTREO DEL ALIENTO ALVEOLAR .....	39
4.3 ANÁLISIS POR CG-EM-DIF.....	41
4.4 ANÁLISIS CUALITATIVO .....	42
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
4.5.1 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES .....	43
4.5.2 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA .....	43
4.5.3 ANOVA.....	44
4.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	44
4.6.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	44
4.6.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LAS MUESTRAS DE ALIENTO .....	46
CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
5.1 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES.....	47
5.2 MUESTREO DEL ALIENTO ALVEOLAR .....	55
5.3 ANÁLISIS POR CG-EM-DIF.....	55
5.4 ANÁLISIS CUALITATIVO .....	57
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	62
5.5.1 ANOVA.....	62
5.5.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA .....	63
5.5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES .....	65
5.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	70
5.6.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	70
5.6.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LAS MUESTRAS DE ALIENTO .....	71
CAPITULO 6: CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS.....	77
INDICE DE FIGURAS TABLAS Y ECUACIONES .....	81

# RESUMEN

---

La investigación de los metabolitos asociados a la prediabetes por trazas moleculares en el aliento exhalado, involucra el análisis, con gran sensibilidad, de los componentes moleculares de éste. Esta metodología se ha considerado recientemente como una alternativa de diagnóstico no invasivo para enfermedades como la prediabetes, la *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DMT2) (Gallego 2016) y muchas otras enfermedades (Pereira 2014). Además, el diagnóstico de la prediabetes es un paso fundamental para la detección temprana y la prevención de la DMT2. La DMT2 es una de las principales causas de muerte y una enfermedad que ataca a una gran parte de la población mexicana.

Esta investigación involucra el análisis cualitativo, estadístico y cuantitativo de 25 compuestos definidos en el trabajo previo de Gallego (2016) como potenciales biomarcadores de DMT2. Éste estudio previo, sirvió para mostrar que la técnica permite distinguir entre pacientes sanos y diabéticos, y por lo tanto tiene el contraste necesario para emprender estudios más refinados de diagnóstico. El presente trabajo, motivo de esta tesis, va un paso más adelante y explora la posibilidad de diagnosticar a la prediabetes, lo cual, es un reto importante, incluso para los métodos clínicos más convencionales.

En el presente trabajo, se estudió el aliento exhalado de una muestra poblacional compuesta por 38 individuos caracterizados por pruebas hematológicas en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Los individuos fueron separados en 6 grupos, empleando criterios clínicos estandarizados basados en la NOM-015 y NOM-037 de la SSA y los criterios de la ADA. El primer grupo fue catalogado como "sujetos normoglicémicos" o grupo de control (TNG). El segundo y tercer grupo incluyeron a sujetos con prediabetes, siendo catalogados como "sujetos intolerantes a la glucosa" (ITG) y "sujetos con glucosa alterada en ayuno e intolerantes a la glucosa" (GAA+ITG). El cuarto grupo fue catalogado como "sujetos con DMT2 recién diagnosticados" (RDMT2). El quinto grupo fue catalogado como "sujetos con DMT2 de larga duración" (DMT2) y finalmente el sexto grupo fue catalogado como "sujetos con DMT2 en estado crítico" (CDMT2).

Los compuestos en el aliento exhalado de 38 individuos fueron identificados por la técnica cromatográfica CG-EM-DIF.

Con el estudio de los compuestos de los 6 grupos, que comprende un gran espectro de evolución de la DMT2, especialmente los grupos con sujetos en algún estadio de la DMT2, se fortaleció la selección de los potenciales biomarcadores para la DMT2 estudiados por Gallego (2016).

De los compuestos estudiados se encontró que 14 metabolitos son potenciales biomarcadores de la prediabetes. Algunos potenciales biomarcadores de la prediabetes son la 2-butanona, el 1-hepteno y el p-xileno.

Algunos de los 14 metabolitos son capaces de discriminar entre ambos grupos de prediabetes estudiados. Dentro de los potenciales biomarcadores de la prediabetes que cumplen esta condición se encuentra la acetona y el 1-propanol para el tipo de prediabetes GAA+ITG y el benzaldehído para el tipo de prediabetes ITG.

# ABSTRACT

---

The investigation of metabolites associated with prediabetes by molecular traces in the exhaled breath, considers the analysis, with great sensitivity, of the molecular components of this one. This methodology has recently been considered as a non-invasive diagnostic alternative for diseases such as prediabetes, Diabetes Mellitus type 2 (DMT2) (Gallego 2016) and many other diseases (Pereira 2014). In addition, the diagnosis of prediabetes is a critical step in the early detection and prevention of T2DM. T2DM is one of the main causes of death and a disease that attacks a large part of the Mexican population.

This research involves the qualitative, statistical and quantitative analysis of 25 compounds defined in the previous work of Gallego (2016) as potential biomarkers of T2DM. This previous study served to show, that the technique allows to distinguish between healthy and diabetic patients, and therefore has the necessary contrast to undertake more refined diagnostic studies. The present work, goes a step further and explores the possibility of diagnosing pre-diabetes, which is a major challenge, even for more conventional clinical methods.

In the present study, the exhaled breath of a population sample composed of 38 individuals characterized by hematological tests at the General Hospital of Mexico "Dr. Eduardo Liceaga ". Individuals were separated into 6 groups, using standardized clinical criteria based on NOM-015 and NOM-037 of SSA of México and ADA criteria. The first group was categorized as "normoglycemic subjects" or control group (TNG). The second and third groups included subjects with prediabetes, being classified as "subjects intolerant to glucose" (ITG) and "subjects with altered glucose in fasting and glucose intolerant" (GAA + ITG). The fourth group was classified as "newly diagnosed DMT2 subjects" (RDMT2). The fifth group was classified as "subjects with long-term DMT2" (DMT2) and finally the sixth group was classified as "subjects with DMT2 in critical condition" (CDMT2).

Compounds in the exhaled breath of 38 individuals were identified by the CG-EM-DIF chromatographic technique.

The study of the compounds of the 6 groups, comprising a large spectrum of DMT2 evolution, especially the groups with subjects at some stage of T2DM, strengthened the selection of the potential biomarkers for DMT2 studied by Gallego (2016 ).

Of the compounds studied, it was found that 14 metabolites are potential biomarkers of prediabetes. Some potential biomarkers of prediabetes are 2-butanone, 1-heptene and p-xylene.

Some of the 14 metabolites were able to discriminate between both groups of prediabetes studied. Among the potential biomarkers of prediabetes that meet this condition are acetone and 1-propanol for the type of prediabetes GAA + ITG and benzaldehyde for the type of prediabetes ITG.

# CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

---

El análisis de los metabolitos presentes en el aliento exhalado, actualmente, es un tema de investigación bastante activo especialmente en Europa, Asia y Estados Unidos. El propósito de este tipo de estudios es producir un método de diagnóstico no invasivo en general. En particular en años recientes, se ha mostrado su efectividad en el diagnóstico de patologías hepáticas, metabólicas y cánceres, principalmente. (Amman, 2013)

El análisis del aliento exhalado se basa en el hecho de que, dentro del cuerpo humano, existe una generación continua de compuestos volátiles. Estos compuestos, también conocidos como metabolitos, son parcialmente emitidos a través del aliento exhalado. Sin embargo estas exhalaciones se presentan en cantidades muy pequeñas relativas al contenido del aliento total, esto es, en partes por mil millón, en comparación con el CO<sub>2</sub> y el vapor de agua. Estos compuestos volátiles contienen información concerniente a las condiciones metabólicas y fisiológicas del sujeto bajo estudio. (Amman 2013; Cao 2006)

Se ha probado que el análisis del aliento exhalado es un procedimiento importante para la evaluación y monitoreo del desarrollo de una enfermedad al analizar las cantidades de trazas moleculares de una muestra gaseosa conocida y al poder ser asociadas con una patología en particular. (Amman 2013)

El método de análisis por aliento puede proveer, adicionalmente, una herramienta complementaria para diagnósticos médicos convencionales de una enfermedad, ya que es posible analizar, simultáneamente, centenas de compuestos relacionados al metabolismo humano. (Pereira 2014)

Recientemente esta metodología ha sido aplicada para el diagnóstico de enfermedades que son difíciles de diagnosticar de manera temprana, como la Diabetes Mellitus tipo 2, dado a que en etapas tempranas es asintomática.

En México, una de las principales causas de muertes es la Diabetes Mellitus tipo II. Cuando esta enfermedad es detectada y atendida en una etapa temprana mediante una dieta balanceada y ejercicio, se puede prevenir sus complicaciones.

A pesar de la gran conveniencia del procedimiento, uno de los mayores retos es el vincular, de manera inequívoca, los compuestos detectados y cuantificados, a las vías metabólicas que se producen como resultado de la condición de salud o patología en la que se encuentra el paciente.

Para la implementación exitosa de este método es necesario la estandarización y definición de líneas basales de normalidad en una población.

En estudios anteriores dentro del equipo de trabajo del presente proyecto, se logró definir los parámetros de control de una población normoglicémica en la Tesis: "Análisis de Metabolitos Presentes en el Aliento, determinación de la línea basal" por A. Gallego. En estos parámetros de control, además de obtener una distribución basal, se logró una identificación tentativa de metabolitos asociados a la diabetes. (Gallego 2016)

El presente trabajo de tesis, se apoya en esta distribución basal y en los metabolitos encontrados en sujetos diabéticos. La metodología de Gallego (2016) será aplicada para estudiar, principalmente, a sujetos con prediabetes, que es una condición que tiene gran relevancia para el diagnóstico de la diabetes de manera temprana. Además, se aplicará la metodología al estudio de poblaciones normoglicémicas, diabéticas de reciente diagnóstico, diabéticas de larga duración y diabéticos críticos.

Se consideró como muestra de población normoglicémica a aquellos sujetos que presentaran valores normales en las pruebas hematológicas aplicadas, de acuerdo a la NOM-015 y la NOM-037 de la secretaria de salud de México y a los valores normales establecidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2016)

Se consideró como muestra de población prediabética a aquellos sujetos que presentaran una glucosa alterada en ayuno, intolerancia a los carbohidratos o la presencia de ambos, de acuerdo a los valores de referencia de la NOM-015 de la Secretaría de Salud Pública de México.

Se consideró como la muestra de población diabética reciente a aquellos sujetos que fueron diagnosticados con diabetes por medio de la curva de tolerancia a la glucosa, de acuerdo a los valores umbrales de referencia de la NOM-015 de la Secretaría de Salud Pública de México. Al presentar valores umbrales, estos sujetos apenas empiezan a presentar los síntomas de la enfermedad.

Se consideró como la muestra de población diabética de larga duración a aquellos sujetos que fueron diagnosticados con diabetes por medio de glucosa en ayuno o mediante niveles de hemoglobina glucosilada, de acuerdo a los valores de referencia de la NOM-015 de la Secretaría de Salud Pública de México. Estos sujetos, nunca habían sido diagnosticados, pero ya presentaban la enfermedad por un tiempo prolongado.

Para la población de diabéticos críticos, se consideró a aquellos sujetos que presentaran diabetes en un estado muy avanzado, es decir, que presentara y/o superara los niveles reportados de glucosa capilar en la NOM-015.

La determinación de las condiciones de las personas voluntarias que participaron en este proyecto fue realizada por el equipo de trabajo encabezado por la Dr. Adriana Monroy Guzmán en el Hospital General de México.

El análisis de las muestras de aliento fue realizado en el Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM utilizando cromatografía de gases acoplada a detectores de espectrometría de masas e ionización de flama (CG/EM-DIF).

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó tanto con la inyección de estándares gravimétricos, como con el software ChemStation de Agilent Technologies.

El estudio de correlaciones multivariado se llevó a cabo utilizando el software R.

El estudio de las poblaciones diabética y diabética crítica tiene como objetivo reafirmar la identificación de los compuestos alterados, estudiados anteriormente, así como mantener los límites, entre una población normoglicémica y diabética.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo identificar los compuestos que presenten una diferencia en concentraciones que sea significativa entre poblaciones normoglicémicas y prediabéticas, con la finalidad de marcar las bases de identificación de la alteración metabólica conocida como prediabetes. Además de realizar un análisis estadístico que permitirá presentar las correlaciones de los compuestos en ambas poblaciones.

El desarrollo de este trabajo pretende contribuir al desarrollo de métodos que permitan detectar de manera oportuna la prediabetes, padecimiento que cursa asintomático.

# CAPITULO 2: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

---

## 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El análisis del aliento exhalado es un método de diagnóstico no invasivo que se ha convertido, sobre todo en Europa, en un procedimiento importante en la evaluación del estado de salud y el desarrollo de una enfermedad a través del análisis de trazas moleculares presentes en muestras en fase gaseosa. (Amman 2013; Ramírez 2015)

Lo beneficioso de este método es que no hace falta punzar o extraer fluidos del paciente para realizar un diagnóstico clínico. Además de lo anterior, simultáneamente, proporciona de manera complementaria el análisis de decenas de metabolitos relacionados al metabolismo humano. (Amman 2013; Ramírez 2015)

La diabetes es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un defecto de la secreción de la hormona insulina por el páncreas. (Frenk 2011)

La diabetes es actualmente una de las primeras causas de muerte de los mexicanos. Prevenirla y diagnosticarla a tiempo es de alta relevancia.

En México la mortalidad por diabetes ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas, a una tasa de 15.5 defunciones por 100,000 habitantes. Esto ha implicado que esta patología ha llegado a ocupar, desde 1997 el tercer lugar de la mortalidad general y en ese lugar se mantuvo hasta 1999. En ese año ocurrieron 443,950 defunciones y de estas, 45,632 se debieron a diabetes. Esto representó un 10.3% de las defunciones, con variaciones por entidad federativa que van de 6.2% en el estado de Chiapas a 13.6% en el estado de Coahuila. (Frenk 2011)

Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años con respecto a la media nacional que es de 72.6 años para hombres y de 77.8 años para mujeres. En México, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción en la esperanza de vida. (Hernández 2013)

El panorama resulta difícil de abordar, por lo que es necesario contar con Programas de Acción Estatales, congruentes con los nacionales e internacionales. (Frenk 2011)

Dentro de la historia natural de la enfermedad se ha señalado un estado metabólico previo que no corresponde a la diabetes pero que tampoco se ubica dentro de la normalidad, es decir, se trata de un estado intermedio que se ha redefinido

como prediabetes. (ALAD 2009) A partir de este estadio, de no mediar acciones preventivas, se evoluciona a la diabetes de manera explícita. Es por esto que es fundamental identificar este estadio de la patología e implementar acciones preventivas.

En decenas de estudios se ha demostrado que al identificar e intervenir en el estilo de vida de las personas con prediabetes, es posible evitar la progresión a la diabetes hasta en un 58% de los casos. Esto pone de manifiesto que el intervenir a los pacientes en estado de pre-diabetes es posible evitar un deterioro progresivo o desaceleración de la enfermedad. Es razonable anticipar que la detección y tratamiento de la prediabetes sea una estrategia eficiente para lidiar con la epidemia de diabetes mellitus y toda consecuencia médica, social y económica que esta conlleva. (ALAD 2009)

En estudios anteriores, en el mismo grupo de trabajo de esta tesis, se han identificado compuestos que han logrado diferenciar a una población de sujetos sanos con una población de sujetos diabéticos. Lo anterior apoya la idea de que es posible identificar la diabetes en un estadio previo, es decir en la etapa prediabética, otorgando la gran posibilidad de detener la progresión y/o emergencia de la enfermedad. (Gallego 2016)

La motivación central de este proyecto de tesis consiste en contribuir con el desarrollo de técnicas no invasivas y potencialmente socializables en su implementación, para diagnosticar la prediabetes.

## **2.2 HIPÓTESIS**

Es posible identificar potenciales biomarcadores de sujetos que presentan prediabetes, por medio del análisis de su aliento alveolar. Para realizar esta identificación es necesario contrastar los compuestos presentes en sujetos de control con sujetos con prediabetes. El análisis del aliento de los sujetos muestreados tomará como punto de partida a los compuestos identificados como potenciales biomarcadores de la diabetes mellitus tipo 2 en el trabajo previo de Gallego (2016).

Además, es posible identificar y cuantificar las correlaciones que existan entre la concentración de compuestos orgánicos volátiles de los 3 principales grupos de estudio de este trabajo: sujetos de control, sujetos prediabéticos y sujetos diabéticos, otorgando un gran espectro de información de la evolución de la enfermedad.

## **2.3 JUSTIFICACIÓN**

La diabetes es una enfermedad crónica provocada por múltiples factores. Esta enfermedad se coloca en la segunda causa de muerte en México. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente

ocasiona complicaciones de salud graves tales como: ceguera, falla renal, amputación de extremidades y muerte prematura. Además, que es una enfermedad que reduce la esperanza de vida por hasta por 10 años en la población mexicana. (Hernández 2013)

En México, los costos de atención por paciente van desde 700 hasta 3 200 dólares anuales, alcanzando los 778 MM USD, lo que se traduce en 5 a 14% del presupuesto en salud destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones. (Hernández 2013; Barquera 2013)

Es un hecho que la diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad prevenible, si se realiza un diagnóstico en el estadio previo conocido como prediabetes. El desarrollar métodos de diagnóstico temprano que se puedan aplicar en el sector salud pueden aminorar el impacto que tiene la diabetes sobre la calidad de vida de la población mexicana. (Hernández 2013)

## **2.4 OBJETIVO GENERAL**

En base a los resultados obtenidos del trabajo de Gallego (2016), donde se presentan compuestas como potenciales biomarcadores para la Diabetes Mellitus tipo 2, se pretende vincular estos mismos metabolitos, y probablemente nuevos, en un grupo de personas prediabéticas. Este análisis se realiza con el propósito de especificar la condición de prediabetes, al realizar un contraste entre los metabolitos de personas normoglicémicas y los metabolitos presentes en personas prediabéticas. De esta forma se logrará diagnosticar a la prediabetes de manera que se puedan realizar intervenciones dirigidas a evitar al paciente el desarrollo de la diabetes.

Las actividades a realizar para cumplir este propósito son:

- La implementación de una técnica no invasiva para detectar a la prediabetes por medio del análisis de compuestos orgánicos volátiles presentes en el aliento exhalado.
- La aplicación de bases metodológicas, de métodos de recolección y de análisis de muestras. Estas actividades fueron desarrolladas anteriormente en el grupo de trabajo.
- Realizar el análisis, contrastaste y correlación de datos cualitativos y cuantitativos de los compuestos presentes en el aliento de los grupos de sujetos de estudio.

## **2.5 OBJETIVOS PARTICULARES**

Implementar el protocolo de toma de muestras de aliento alveolar y evaluar la repetibilidad de los métodos llevados a cabo anteriormente en el grupo.

Implementar y optimizar el sistema portátil de toma de muestras de aliento alveolar del trabajo anterior.

Realizar la identificación y cuantificación directa e indirecta de compuestos orgánicos volátiles presentes en pacientes normoglicémicos, prediabéticos y diabéticos, mediante cromatografía de gases acoplado a detectores de ionización de flama y espectrómetro de masas.

Realizar un análisis estadístico de los metabolitos de interés en las poblaciones de estudio que permita establecer una correlación entre metabolitos específicos y un estadio particular de prediabetes. Lo anterior también permitirá establecer intervalos de confiabilidad entre las diferentes patologías de diabetes y prediabetes.

Realizar el análisis de componentes principales de los compuestos de interés de las poblaciones de estudio, y constatar que el grupo de prediabetes se encuentra aislado del espectro, adquirido por Gallego (2016), entre personas normoglicémicas y diabéticas.

# CAPITULO 3: ANTECEDENTES

---

## 3.1 FUNDAMENTOS DEL METABOLISMO HUMANO

El metabolismo consiste en todas aquellas transformaciones químicas que sufren los nutrientes con fines de obtención de energía, manipulación de la materia por parte de las células y obtención de elementos estructurales o reguladores de las funciones biológicas. El metabolismo humano es una actividad química altamente coordinada que mantiene el estado vital. (Guyton 2011)

A las sustancias que se originan como resultado del metabolismo a partir de la digestión u otros procesos químicos corporales se les conoce como metabolitos. Los centenares de reacciones químicas que integran el metabolismo están articulados en largas secuencias de reacciones consecutivas ligadas entre sí por intermediarios comunes, de manera que el producto de cada reacción resulta en el sustrato o reactivo de la siguiente. Estas secuencias de reacciones reciben el nombre de rutas metabólicas. La existencia de un intermediario común entre dos reacciones consecutivas hace posible la transferencia de energía química entre ellas. (Guyton 2011)

Las rutas metabólicas a su vez están organizadas en un complejo entramado en el que unas están conectadas con otras a través de encrucijadas metabólicas, en las cuales hay un metabolito común a dos o más rutas. (Guyton 2011)

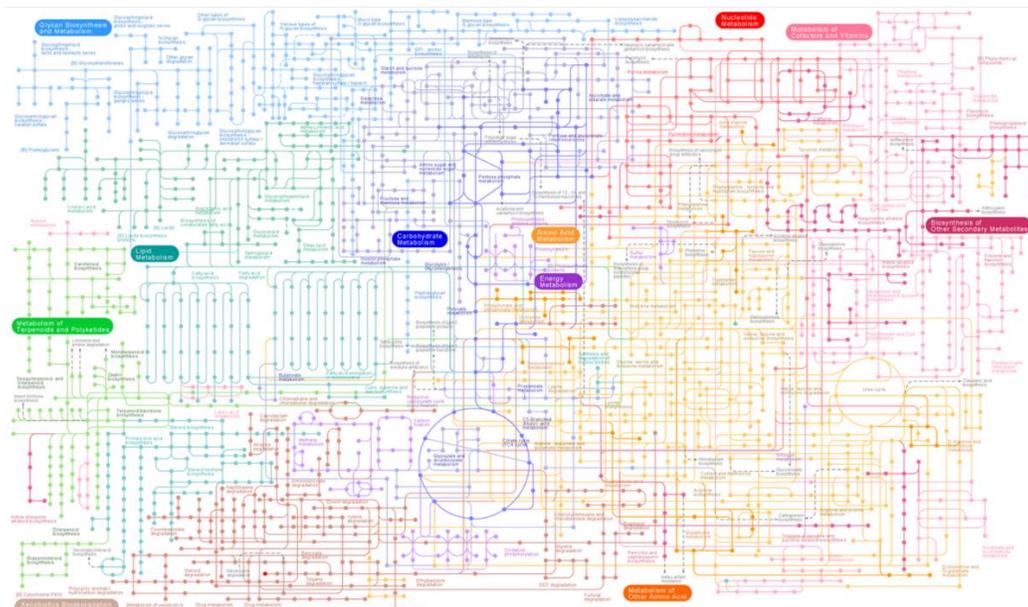


Figura 3.1 Rutas metabólicas. Sin entrar en detalles, el propósito de esta imagen es el de ilustrar la complejidad tan grande de las rutas metabólicas humanas. (KEGG Encyclopedia of Genes and Genome 2017)

En el metabolismo se incluyen dos fases principales de las cuales derivan las principales vías metabólicas: el catabolismo y el anabolismo.

El catabolismo es una de las fases donde las moléculas orgánicas complejas y relativamente grandes se degradan para dar lugar a moléculas de estructura más simple y menor tamaño con la finalidad de obtener energía. Este proceso degradativo, supone una oxidación y además es exergónico ya que va acompañado de la liberación de la energía química inherente a la estructura de las moléculas orgánicas que se degradan. (Guyton 2011)

El anabolismo es la segunda fase y es un proceso endergónico que emplea energía química donde se realizan procesos biosintéticos para formar diversas biomoléculas, tales como los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos a partir de moléculas precursoras de estructura más sencilla y menor tamaño. (Guyton 2011)

El cuerpo humano es una máquina que necesita disponer de "combustible" en forma de energía química. Esta energía es utilizada para el trabajo físico, para obtener calor y mantener así la temperatura corporal, para la construcción de sus propias estructuras, utilizando para ello numerosas reacciones biosintéticas, y para transportar un elevado número de sustancias a través de las membranas celulares. (Guyton 2011)

Un combustible metabólico puede definirse como un compuesto circulante que es tomado por los tejidos para la producción de energía. Existen dos tipos de combustibles para el organismo: exógenos, derivados de la ingesta de alimentos, y endógenos, derivados directamente de los almacenes tisulares (como el glucógeno y los triglicéridos) o de la oxidación incompleta de otros combustibles (como el lactato o los cuerpos cetónicos). (Guyton 2011)

Los principales órganos y tejidos implicados en el metabolismo son el hígado, el músculo, el cerebro, el tejido adiposo y los eritrocitos.

El hígado tiene un papel fundamental ya que es el principal responsable del mantenimiento del equilibrio metabólico interinsular. Entre sus tareas se encuentra el mantenimiento de la glucemia, sintetizan los principales derivados nitrogenados de los aminoácidos, regular el aporte de los diferentes nutrientes a los demás tejidos de acuerdo con la composición de la dieta y las demás circunstancias fisiológicas, síntesis utilización de las diferentes lipoproteínas sanguíneas, síntesis de los compuestos cetónicos a partir de los ácidos grasos y además eliminar residuos producidos por el cuerpo y sustancias tóxicas que se ingieren. (Guyton 2011)

Además de aprovechar los productos metabólicos, el cuerpo necesita excretar los productos secundarios del metabolismo y demás sustancias tóxicas. Las vías de excreción principales son el riñón, el pulmón y el sistema hepatobiliar.

El riñón es el órgano más importante para la excreción de la mayoría de las sustancias y el pulmón lo es para gases y compuestos volátiles. Las sustancias excretadas eliminadas en las heces son principalmente componentes ingeridos no absorbidos o

metabolitos excretados en la bilis y no reabsorbidos en el tubo intestinal. Las vías de menos cuantía en términos de excreción son las glándulas salivales, el estómago, el intestino, el colon, las glándulas sudoríparas, la mama, las glándulas lagrimales, el pelo y la piel. (Guyton 2011)

### **3.2 FUNDAMENTOS DE LA RESPIRACIÓN E INTERCAMBIO GASEOSO**

La respiración es la acción de introducir aire fresco dentro de los bronquiolos, ductos alveolares y atrios de los pulmones.

Las cuatro funciones principales de la respiración son: 1) la ventilación pulmonar, que se refiere al flujo de entrada y salida de aire entre la atmosfera y los alveolos pulmonares; 2) la difusión de oxígeno y de dióxido de carbono entre los alvéolos y la sangre; 3) el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en la sangre y los líquidos corporales hacia las células de los tejidos corporales y desde las mismas, y 4) la regulación de la ventilación. (Guyton 2011)

La función de la ventilación pulmonar es renovar continuamente el aire de las zonas de intercambio gaseoso de los pulmones, en las que el aire está próximo a la sangre pulmonar. Estas zonas incluyen los alveolos, los sacos alveolares, los conductos alveolares y los bronquiolos respiratorios. (Guyton 2011)

Parte del aire que respira una persona nunca llega a las zonas de intercambio gaseoso, sino que simplemente llena las vías aéreas en las que no se produce intercambio gaseoso, como la nariz, la faringe y la tráquea. Este aire se denomina aire del espacio muerto, porque no es útil para el intercambio gaseoso. (Guyton 2011)

Durante la espiración se expulsa primero el aire del espacio muerto, antes de que el aire procedente de los alveolos llegue a la atmosfera. Por tanto, el espacio muerto es muy desventajoso para retirar los gases espiratorios de los pulmones. (Guyton 2011)

El volumen de aire normal del espacio muerto de un varón adulto joven es de aproximadamente 150 ml. Este valor aumenta ligeramente con la edad. (Guyton 2011)

La capacidad pulmonar total es el volumen máximo al que se pueden expandir los pulmones con el máximo esfuerzo posible (aproximadamente 5.800 ml); es igual a la capacidad vital más el volumen residual. (Guyton 2011)

Todos los volúmenes y capacidades pulmonares son aproximadamente un 20-25% menores en mujeres que en varones, y son mayores en personas de constitución grande y atléticas que en personas de constitución pequeña y asténicas. (Guyton 2011)

Después de que los alveolos se ventilan con aire limpio, la siguiente fase del proceso respiratorio es la difusión del oxígeno desde los alveolos hacia la sangre

pulmonar y la difusión del dióxido de carbono en la dirección opuesta, desde la sangre. El proceso de difusión se aplica para todos los gases importantes en la fisiología respiratoria y se define como el movimiento aleatorio de moléculas en todas las direcciones a través de la membrana respiratoria y los líquidos adyacentes. Esto también se aplica a los gases que están disueltos en los líquidos y en los tejidos del cuerpo. (Guyton 2011)

Para que se produzca la difusión debe haber una fuente de energía. Esta procede del movimiento cinético de las propias partículas.

La presión es producida por múltiples impactos de partículas en movimiento contra una superficie. Por tanto, la presión de un gas que actúa sobre las superficies de las vías respiratorias y de los alveolos es proporcional a la suma de las fuerzas de los impactos de todas las moléculas de ese gas que chocan contra la superficie en cualquier momento dado. Esto significa que la presión es directamente proporcional a la concentración de las moléculas del gas. (Guyton 2011)

La difusión neta de un gas en una dirección es efecto de un gradiente de concentración. Si una cámara de gas o una solución tiene una concentración elevada de un gas particular en un extremo de la cámara y una concentración baja en el otro extremo, se producirá difusión neta del gas desde la zona de concentración elevada hacia la zona de concentración baja. (Guyton 2011)

En fisiología respiratoria se manejan muestras de gases en mezclas, principalmente de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. La velocidad de difusión de cada uno de estos gases es directamente proporcional a la presión que genera ese gas solo, que se denomina presión parcial de ese gas. (Guyton 2011)

Los gases disueltos en agua o en los tejidos corporales también ejercen una presión, porque las moléculas de gas disuelto se mueven de manera aleatoria y tienen energía cinética. Además, cuando el gas disuelto en el líquido entra en contacto con una superficie, como la membrana de una célula, ejerce su propia presión parcial de la misma manera que un gas en la fase gaseosa. Las presiones parciales de diferentes gases disueltos se denominan de la misma manera que las presiones parciales en estado gaseoso. (Guyton 2011)

La presión parcial de cada uno de los gases en la mezcla de gas respiratorio alveolar tiende a hacer que las moléculas de ese gas se disuelvan en la sangre de los capilares alveolares. Por el contrario, las moléculas del mismo gas que ya están disueltas en la sangre están rebotando de manera aleatoria en el líquido de la sangre, y algunas de estas moléculas que rebotan escapan de nuevo hacia los alveolos. (Guyton 2011)

La velocidad a la que escapan es directamente proporcional a su presión parcial en la sangre. La dirección de la difusión neta está determinada por la diferencia entre las dos presiones parciales. Si la presión parcial es mayor en la fase gaseosa de los alveolos, como ocurre normalmente en el caso del oxígeno, entonces más moléculas difundirán hacia la sangre que en la otra dirección. Por otro lado, si la presión parcial del

gas es mayor en el estado disuelto en la sangre, como ocurre normalmente en el caso del dióxido de carbono, la difusión neta se dirigirá hacia la fase gaseosa de los alveolos. (Guyton 2011)

La unidad respiratoria está formada por un bronquíolo respiratorio, los conductos alveolares, los atrios y los alvéolos. Hay aproximadamente 300 millones de alveolos en los dos pulmones, y cada alveolo tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 mm. Las paredes alveolares son muy delgadas y entre los alveolos hay una red casi sólida de capilares interconectados. De hecho, debido a lo extenso del plexo capilar, se ha descrito que el flujo de sangre en la pared alveolar es una lámina de sangre que fluye. Así, es evidente que los gases alveolares están muy próximos a la sangre de los capilares pulmonares. Además, el intercambio gaseoso entre el aire alveolar y la sangre pulmonar se produce a través de las membranas de todas las porciones terminales de los pulmones, no solo en los propios alveolos. Todas estas membranas se conocen de manera colectiva como la membrana respiratoria, también denominada membrana pulmonar. (Guyton 2011)

El aire alveolar no tiene en modo alguno las mismas concentraciones de gases que el aire atmosférico. Hay varias razones para estas diferencias. Primero, el aire alveolar es sustituido solo de manera parcial por aire atmosférico en cada respiración. Segundo, el oxígeno se absorbe constantemente hacia la sangre pulmonar desde el aire pulmonar. Tercero, el dióxido de carbono se está difundiendo constantemente desde la sangre pulmonar hacia los alveolos. Y cuarto, el aire atmosférico seco que entra en las vías respiratorias es humidificado incluso antes de que llegue a los alveolos. (Guyton 2011)

### ***3.3 VOLÚMENES DENTRO DEL CUERPO HUMANO Y EN CONDICIONES AMBIENTALES***

La medición de un volumen gaseoso se realiza a la presión y temperatura registradas en el equipo, donde las moléculas gaseosas se encuentran a presión y temperatura ambiente (PTA). Además, el gas expirado se encuentra saturado con vapor de agua, que se le conoce como temperatura ambiente, presión y saturación. Las condiciones ambientales varían a lo que los volúmenes necesitan ser convertido a condiciones estándar, las cuales para propósitos generales se obtiene del pulmón. En el pulmón, el gas se encuentra a temperatura, presión y saturación corporal. En el sistema tradicional de unidades, la cantidad de gas es reportada como un volumen bajo condiciones estándar ( $T=0^{\circ}\text{C}$ ,  $P=101.3\text{ kPa}$  y saturación 0 por la eliminación del vapor de agua). Un volumen en estas unidades se encuentra a temperatura y presión en seco. (11)

La relación del volumen de un gas con la presión es descrita por la ley de Boyle que establece que a una temperatura constante un volumen gaseoso es inversamente proporcional a su presión. (Cotes 2006)

La relación de un volumen con la temperatura ambiente es el tema de la ley de Charles que establece que a una presión constante, el volumen de un gas es proporcional a su temperatura absoluta. (Cotes 2006)

Estas dos ecuaciones son combinadas en la ecuación general de gases que representa que para una masa dada para dos condiciones fijas. (Cotes 2006)

$$P_1 \frac{V_1}{T_1} = P_2 \frac{V_2}{T_2} \quad \text{Ec. 1}$$

Esta ecuación es usada para convertir volúmenes a condiciones corporales (Ec. 2) o condiciones estandar (Ec. 3) de una medida hecha en condiciones ambientales.

$$V_{BTPS} = V_{ATP} * \frac{273+37}{273+t} * \frac{P_B - P_{H_2O}(t)}{P_B - P_{H_2O}(37)} \quad \text{Ec. 2}$$

$$V_{STPD} = V_{ATP} * \frac{273}{273+t} * \frac{P_B - P_{H_2O}(t)}{P_{B,standard}} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde V es el volumen del gas bajo las condiciones especificadas, t es la temperatura ambiental y 37 es la temperatura del cuerpo en grados celcius, P<sub>B</sub> es la presión barométrica y P<sub>H<sub>2</sub>O</sub> es la presión del vapor acuoso a la temperatura indicada. (Cotes 2006)

La relación entre la presión de un gas y la cantidad en una solución bajo condiciones de equilibrio es descrita por la ley de Henry. Esta postula que la cantidad de gas disuelto en un líquido es proporcional a la presión parcial del gas en contacto con el líquido siempre que no haya una reacción química. La cantidad varía con la temperatura y debe ser especificada. (Guyton 2011; Cotes 2006)

La ley de Henry es usada para describir consecuencias de la exposición a cambios barométricos de presión. (Guyton 2011; Cotes 2006)

### **3.4 PATOLOGÍAS DETECTABLES POR VOCs**

Muchos de los compuestos orgánicos volátiles (COV) generados por el metabolismo se encuentran en el aliento exhalado de los humanos. La composición de este aliento es influenciada por varios factores. El principal factor radica en que el aliento exhalado refleja la composición volátil del torrente sanguíneo. Demás factores se relacionan con la composición del aire inhalado, los alimentos con constituyentes volátiles, la dieta y su influencia en el metabolismo, la influencia de los procesos metabólicos normales y relacionados a la enfermedad, el microambiente en los pulmones, intestinos y cavidad oral, y las diferencias genéticas y/o fenotípicas. (Amman 2013; Amann 2014; Lourenço 2014; Fenske 1999; Phillips 1999)

A pesar de que el aliento es una mezcla muy compleja, existen diversas maneras de extraer información específica de una muestra de aliento exhalado.

El mayor provecho del diagnóstico basado en el análisis de aliento radica en que puede ofrecer una metodología no invasiva, en tiempo real y que puede monitorear el estado metabólico del individuo.

En la actualidad se estima que existen más de 3000 COVs representados en menos de 100 partes por millón (ppm) en el volumen total de aliento exhalado de los seres humanos. (Amman 2013; Amann 2014; Lourenço 2014; Fenske 1999; Phillips 1999)

Entre los COVs más abundantes se encuentra la acetona, el isopreno y el propanol, medidos en cantidades de apenas una fracción de ppm mientras que las cetonas, aldehídos y el pentano se encuentran en concentraciones de partes por billón (ppb) o partes por trillón (ppt). (Amman 2013; Amann 2014; Lourenço 2014; Fenske 1999; Phillips 1999)

En la actualidad existen unos pocos exámenes clínicos ratificados que emplean el análisis del aliento exhalado, entre ellos se encuentran: (Amman 2013)

- La prueba de dióxido de carbono en la respiración o capnografía
- La prueba de monóxido de carbono para ictericia neonatal
- La prueba de hidrógeno para detectar deficiencia de disacaridasa, el tiempo de tránsito intestinal, sobre crecimiento bacteriano, estasis intestinal.
- La prueba de óxido nítrico para la terapia del asma.
- La prueba de aliento para la detección del rechazo del trasplante de corazón.

Ciertamente, la popularidad para emplear el análisis diagnóstico basado en el análisis de aliento se ha ido incrementando, al igual que las técnicas empleadas para su análisis.

### ***3.5 PERSPECTIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES POR VOCS EN EL FUTURO***

Entre las enfermedades que se han estudiado se encuentra una extensa lista que incluyen: Enfermedades oncológicas, enfermedades pulmonares, enfermedades cardiovasculares, fallas digestivas, fallas renales crónicas, enfermedades hepáticas (que incluyen a la diabetes), infecciones por helicobacter pilori y Schizophrenia. (Pereira 2014)

Dentro de las técnicas más populares para el análisis del aliento se encuentran:

La cromatografía de gases, la espectroscopía por reacción de transferencia de protones, la selección de iones en tubo de flujo, la espectroscopía láser y sensores químicos. (Pereira 2014)

Los métodos de clasificación de compuestos y aproximaciones estadísticas más empleados en el análisis del aliento humano son: el análisis de componentes principales, el análisis de varianza, el análisis de discriminantes lineales, el análisis de datos multivariados y el análisis de reconocimiento de patrones entre otros. (Pereira 2014)

En la Tabla 1 se presentan las enfermedades más notorias y las técnicas aplicadas en el análisis de aliento.

<b>Tabla 1. Caracterización de compuestos orgánicos volátiles seleccionados del aliento exhalado reportados en la literatura (Pereira 2014)</b>			
<b>Enfermedad</b>	<b>Compuestos (biomarcadores putativos)</b>	<b>Metodologías empleadas</b>	
<b>Cáncer de pulmón</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 1-octano</li> <li>* Acetona</li> <li>* Pentano</li> <li>* Estireno</li> <li>* 2-hidroxiacetaldehido</li> <li>* 3-hidroxi 2-butanona</li> <li>* 4-hidroxihexanal</li> <li>* Pentanal</li> <li>*Patrones de VOCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Isopreno</li> <li>* Metanol</li> <li>* Heptano</li> <li>* 2-butanone</li> <li>*Formaldehido</li> <li>* Hexanal</li> <li>* Nonanal</li> <li>* Octanal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* MEFS/CG-EM</li> <li>* RTP-EM/CG-EM</li> <li>* Nanoarreglos químicos</li> <li>* TF-RCI-EM</li> <li>* RTP-EM</li> <li>* DSF-MEFS/CG-EM</li> <li>* CG-DIF</li> <li>* e-nose</li> <li>* sensores colorimétricos</li> <li>* nanopartículas de oro</li> <li>* sensor de gas SAW virtual</li> </ul>
<b>Mesotelioma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Ciclopentano</li> <li>*Patrones de VOCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Ciclohexano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* e-nose</li> <li>* DT-CG-EM</li> </ul>
<b>Cáncer de mama</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Nonano</li> <li>* 3 metilundecano</li> <li>* 2 metilpropano</li> <li>* 2 metiloctano</li> <li>* Tetradecano</li> <li>* 1-yodo nonano</li> <li>* Heptanal</li> <li>* Nonanal</li> <li>* 4-metildodecano</li> <li>* 6-metilpentadecano</li> <li>*5,2-metilpropilnonano</li> <li>* 2,5,8,1-isopropilmetilamino</li> <li>* Patrón de reconocimiento de COVs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 5-metiltridecano</li> <li>* Undecano</li> <li>* Dodecano</li> <li>* Tridecano</li> <li>* Pentadecano</li> <li>* Hexanal</li> <li>* Octanal</li> <li>* d- limoneno</li> <li>* 2,3,4-trimetildecano</li> <li>* 3,3-dimetil pentano</li> <li>* 3-metilnonadecano</li> <li>* Perfil de COVs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* e-nose</li> <li>* TD-CG-EM</li> <li>* Dispositivo POC</li> <li>* CG-EM</li> </ul>
<b>Cáncer colonrectal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Decanal</li> <li>* Ciclohexano</li> <li>*4-metiloctane</li> <li>* COVs discriminantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 1,2-pentadieno</li> <li>* metilciclohexane</li> <li>* 1,3-dimetilbenceno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* CG-EM</li> <li>* MEFS/CG-EM</li> </ul>
<b>Cáncer gástrico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* COVs discriminantes</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sensores</li> <li>* CG-EM</li> </ul>
<b>Cáncer de cabeza y cuello</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* COVs discriminantes</li> <li>* Patrón de reconocimiento de COVs</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* e-nose</li> <li>* CG-EM</li> </ul>

**Continuación Tabla 1**

<b>Cáncer de hígado</b>	* 2,3-dihidrobenzofurano * cloruro de metanosulfurilo * 1-octen-3-ol * 3,2-hidroxiбутanona * estireno	* ácido acético * etanol * hexanal * octano * decano	* Sensores * CG-EM * MEFS/CG-EM
<b>Inflamación de vías aéreas</b>	* Patrón de reconocimiento de COVs		* e-nose
<b>Asma</b>	* Decano * Tetradecano * 2,2-dimetilhexano * Dodecano * 2,2,4,6,6-pentametilheptano * COVs discriminantes	* 2,3,6 trimetildecano * 2,1,3-metilbutadieno * Nonano * 2,4 dimetiloctano * 3,6-dimetildecano * Patrones de COVs	* e-nose * CG-EM * CG-TDV-EM
<b>Dificultad respiratoria aguda</b>	* octano * 3-metilheptano * isopreno	* acetaldehído * acetona * n-pentano	* CG-EM * CG-DIF/CG-EM
<b>Embolismo pulmonar</b>	* Patrones de reconocimiento de COVs		* e-nose
<b>Tuberculosis pulmonar</b>	* alcanos y derivados * Derivados del benceno * Patrones de reconocimiento de COVs	* ciclohexano	* CG-EM * Dispositivos POC * TD-CG-SAW
<b>EPCO/enfisema</b>	* Etano * Hexanal * Espectro de masas * Patron de reconocimiento de COVs	* MDA * Heptanal * Perfil de COVs	* CG-DIF * CL-EM/EM * RTP-EM * e-nose * CMC/EMI
<b>Fibrosis cística</b>	* pentano * carbonil sulfuro * etano	* dimetil sulfuro * carbón disulfuro	* CG-EM * CG-DIF
<b>Insuficiencia cardiaca</b>	* Acetona * Isopreno	* Pentano * Trimetil amino	* TSIF-EM * CG-EM * CG
<b>Malsorción de carbohidratos</b>	* Etanetioli	* dimetilsulfuro	* RTP-EM
<b>Cirrosis hepática</b>	* 2-butanona * heptadienol	* metanol * monoterpenos	* RTP-TDV-EM
<b>Hígado graso</b>	* acetona Trimetilamina * Pentano	* Isopreno * Acetaldehído	* TSIF-EM
<b>Hepatitis alcohólica</b>	* 2-propanol * Acetona * Pentano	* Acetaldehído * Etanol * trimetilamina	* TSIF-EM
<b>Academia propionica</b>	* 3-heptanona		* RTP-EM * CG-EM
<b>Diabetes mellitus</b>	* acetona * Tolueno * m-xileno * Tridecano * Patrón de reconocimiento de COVs	* Isopropanol * 2,3,4 trimetilhexano * 2,6,8 trimetildecano * Undecano	* MEFS/CG-EM * TSIF-EM * Espectroscopía láser * e-nose * CG-EM

**Continuación Tabla 1**

<b>Fallas renales crónicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* NO</li> <li>* TMA</li> <li>* Uraemia</li> <li>* Patrón de reconocimiento de COVs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* ozono</li> <li>* Quimioluminiscencia</li> <li>* DT-CG-EM</li> <li>* EMI/CG-EM</li> <li>* e-nose</li> </ul>
<b>Infección por helicobacter pylori</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <math>^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Espectroscopía Ring Down de cavidad (IRC)</li> </ul>

Abreviaciones DT—Desorción térmica; EPCO—Enfermedad Pulmonar crónico obstructiva; MVC—método de validación cruzada; e-nose—Nariz electrónica; CL-EM—Cromatografía líquida-Espectrometría de masas; TF-RCI-EM—Transformada de Fourier- Resonancia ciclotrónica de iones-Espectrometría de masas; CG/EM—Cromatografía de gases/Espectrometría de masas; RTP-TDV-EM—Reacción por transferencia de protones-Tiempo de vuelo-Espectrometría de masas; CMC-EMI—Columna multicapilar-Espectrometría de movilidad iónica; RTP-EM—Reacción por transferencia de protones-Espectrometría de masas; TSIF-EM—Tubo de selección de iones con flujo-Espectrometría de masas; MEFS—Microextracción de fase sólida; EMI—Espectrometría de movilidad iónica; MEFS-DSF—Microextracción de fase sólida con Derivación sobre fibras; IRC—Infrarrojo cercano; COVs—compuestos orgánicos volátiles.

### 3.6 DIABETES

La diabetes es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un defecto de la secreción de la hormona la insulina que es producida en el páncreas.

En una persona no diabética los niveles de glucosa en la sangre se mantienen dentro de unos límites normales muy estrechos, sobrepasando muy rara vez los 100 mg/dl. Cuando una persona no diabética ingiere alimentos, los azúcares que éstos contienen se absorben desde el intestino y pasan a la sangre, tendiendo a elevar los niveles de glucosa en ésta. Tal tendencia a la elevación es inmediatamente detectada por las células productoras de insulina que responden con una secreción rápida de esta hormona. La insulina, permitirá la entrada de glucosa a las células y disminuirá su nivel en la sangre. Una vez que la glucosa ha entrado en los tejidos, es metabolizada y produce energía que es utilizada para mantener las funciones de los órganos y su estructura. (Frenk 2011)

En una persona con diabetes, la producción de la insulina está tan disminuida que se altera todo el mecanismo regulador: las elevaciones de la glucosa sanguínea no son seguidas por un aumento suficiente de la insulina, la glucosa no puede penetrar en las células y su cantidad continúa elevándose. Los síntomas característicos por el aumento de la glucosa en la sangre, debido a la falta de insulina son: poliuria, polidipsia, polifagia, adelgazamiento y astenia. (Frenk 2011)

Las complicaciones de la diabetes pueden llegar a ser problemas de salud incapacitantes y potencialmente mortales dado que los niveles de glucosa en sangre consistentemente altos pueden llevar a enfermedades serias que afecten el corazón y los vasos sanguíneos, los ojos, riñones y los nervios. Las personas con diabetes tienen un

mayor riesgo de desarrollar infecciones y son objeto de amputaciones de las extremidades inferiores, principalmente. (FID 2015)

Los tipos de diabetes se describen brevemente a continuación:

- Diabetes gestacional: Es la hiperglucemia que se detecta por primera vez en cualquier momento durante el embarazo puede ser clasificada como gestacional o en el embarazo. Las mujeres con niveles de glucosa ligeramente elevados son clasificadas como que tienen diabetes gestacional, mientras que las mujeres con niveles de glucosa en la sangre sustancialmente elevados son clasificadas como que tienen diabetes mellitus en el embarazo. La diabetes gestacional normalmente desaparece tras el parto. Sin embargo, las mujeres que han sido diagnosticadas con ella corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional en otros embarazos, así como diabetes tipo 2 más tarde en la vida. Los bebés que nacen de madres con diabetes gestacional también corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en su adolescencia y juventud. (FID 2015)
- Diabetes monogénica, Es el resultado de una mutación genética. Ejemplos de diabetes monogénica incluyen diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes y diabetes mellitus neonatal. (FID 2015)
- La diabetes secundaria, que surge como una complicación de otras enfermedades, como trastornos hormonales o enfermedades del páncreas. (FID 2015)
- Diabetes tipo 1: Es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células-beta productoras de insulina en el páncreas. Como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero la aparición normalmente ocurre en niños y jóvenes adultos. Las personas con esta forma de diabetes necesitan de insulina todos los días para controlar los niveles de glucosa en la sangre y poder vivir. (FID 2015)
- Diabetes tipo 2: en ésta, el cuerpo es capaz de producir insulina, pero se vuelve resistente a ella, de modo que la insulina es ineficaz. Con el tiempo, los niveles de insulina pueden llegar a ser insuficientes Tanto la resistencia, como la deficiencia de insulina pueden llevar a niveles de glucosa en sangre altos. (FID 2015)

Muchas personas con diabetes tipo 2 no son conscientes de su condición durante mucho tiempo porque los síntomas suelen ser menos marcados que en la diabetes tipo 1 y pueden tardar años en ser reconocidos. Sin embargo, durante este tiempo el cuerpo ya está siendo dañado por el exceso de glucosa en sangre. Como resultado, muchas personas ya presentan complicaciones cuando se les diagnostica con diabetes tipo 2.

Existen varios factores de riesgo importantes, los más importantes son el sobrepeso, la inactividad física y la nutrición pobre. Otros factores que juegan un papel importante son la etnicidad, historial familiar de diabetes, historial pasado de diabetes gestacional y edad avanzada. (FID 2015)

En contraste con las personas con diabetes tipo 1, muchas personas con diabetes tipo 2 no requieren tratamiento diario de insulina para sobrevivir. El pilar del tratamiento de la diabetes tipo 2 es la adopción de una dieta sana, aumentar la actividad física y mantener un peso corporal normal. (FID 2015)

El número de personas con diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente en el mundo. Este aumento está asociado con el envejecimiento de la población, el desarrollo económico, el aumento de la urbanización, las dietas menos saludables y la disminución de la actividad física. (FID 2015)

### **3.7 PREDIABETES**

La asociación americana de diabetes define a la prediabetes como un estado que precede al diagnóstico de diabetes tipo 2. Esta condición en común, está en aumento epidemiológico y se caracteriza por elevación en la concentración de glucosa en sangre más allá de los niveles normales sin alcanzar los valores diagnósticos de diabetes. Tabla 2.

La prediabetes se puede identificar a través de una prueba oral de tolerancia a la glucosa (Intolerancia a la Glucosa, ITG) o a través de la glucemia en ayunas (Glucosa Alterada en Ayuno, GAA). (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

La mayoría de las personas con cualquiera de las dos condiciones desarrollará diabetes manifiesta dentro de un período de 10 años. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

Tanto la GAA como la ITG están íntimamente relacionadas con el Síndrome Metabólico y no tan solo indican alto riesgo para el desarrollo de diabetes manifiesta. También, y en forma similar al Síndrome Metabólico, estas alteraciones indican riesgo de enfermedad vascular aterosclerótica. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

La Glucosa Alterada en Ayuno (GAA) es una condición en que los niveles de glucosa en la sangre en ayuno son mayores a los normales, pero no lo suficiente para diagnosticar diabetes mellitus tipo 2. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

Esta ocurre cuando se libera demasiada glucosa en el torrente sanguíneo del hígado durante la noche. El hígado es el principal responsable del suministro adecuado de glucosa en la sangre cuando se presenta un ayuno. Cuando se presenta la glucosa alterada en ayuno, el hígado no responde normalmente a la insulina, llamando a esta condición resistencia a la insulina hepática. Esto da por resultado demasiada glucosa en la sangre al despertar. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

La Intolerancia a la Glucosa (ITG) es una condición donde los niveles de glucosa en la sangre dos horas después de una carga con 75 g de glucosa son elevados a lo normal, pero no lo suficiente para diagnosticar diabetes mellitus tipo 2. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

Esta ocurre cuando la insulina producida no trabaja apropiadamente o no hay la insulina suficiente para satisfacer la demanda o una combinación de ambos. Esto resulta en demasiada glucosa en la sangre durante el día y después de la ingesta de alimentos o al despertar o una combinación de los tres. (ALAD 2009; FID 2015; NSW 2012)

<b>Tabla 2. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para los criterios para la diabetes e hiperglucemia intermedia (2006) (FID 2015)</b>	
La diabetes debe ser diagnosticada cuando se cumplen uno o más de los siguientes criterios:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosa plasmática tras dos horas de una carga oral de 75 g de glucosa 7,8-11,1 mmol/l (140-200 mg/dl)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosa plasmática en ayunas <math>\geq</math> 7,0 mmol/l (126 mg/dl)</li> </ul>	La Glucosa en Ayuno Alterada debe ser diagnosticada si se cumple el siguiente criterio
<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosa plasmática tras dos horas <math>\geq</math> 11,1 mmol/l (200 mg/dl) tras una carga oral de 75g de glucosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosa plasmática en ayunas de 6,1-6,9 mmol/l (110-125mg/dl)</li> </ul>
La tolerancia a la Glucosa Alterada (TGA) debe ser diagnosticada si se cumplen el siguiente criterio	

### **3.8 PROBLEMÁTICA DE LA DIABETES EN MEXICO Y EL MUNDO**

La diabetes es una de las mayores emergencias de salud del siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el mundo, la glucosa en sangre alta es el tercer factor de riesgo principal para la mortalidad prematura, después de la presión arterial alta y el consumo de tabaco. Muchos gobiernos y profesionales de la salud pública, continúan no siendo conscientes del impacto actual de la diabetes y sus complicaciones. (FID 2015)

En muchos estudios, una proporción sustancial de aquellos con diabetes no han sido diagnosticados previamente. Muchas personas continúan sin ser diagnosticadas, porque con frecuencia hay pocos síntomas en los primeros años de la diabetes tipo 2 o síntomas que ocurren, pero no son reconocidos como ligados a la diabetes. (FID 2015)

En todos los países hay personas que viven con diabetes. Sin una prevención efectiva y programas de control, el impacto continuará aumentando en el mundo. (FID 2015)

Unos 415 millones de personas en el mundo, o el 8,8% de adultos entre las edades de 20-79 años se estima que tienen diabetes. Si estas tendencias continúan, en 2040 unos 642 millones de personas, o uno entre diez adultos, tendrá diabetes. (FID 2015)

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID,2015), China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son los países con mayor número de diabéticos.

Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. En México, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años. (Hernández 2013)

El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de calidad de vida para quienes padecen diabetes y sus familias, así como por los importantes recursos que requieren en el sistema público de salud para su atención. (Hernández 2013)

En México, las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3 200 dólares anuales. Estas cifras representan un gasto nacional de 779 MM USD anuales. (Hernández 2013; Barquera 2013)

La prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 tiende a seguir aumentando. En información de la Secretaría de Salud de México se reporta que la prevalencia de diabetes pasó de 8.2% en el año 2000 a 10.7% en 2006. En datos del año 2005 la mortalidad en mujeres mexicanas fue de 66.6 y en hombres de 56.7 por 100,000 habitantes ubicándose como causa número uno de muerte en México. (FID 2015)

### ***3.9 VENTAJAS DE LA DETECCIÓN DE LA PREDIABETES***

Para lograr reducir la carga social de la diabetes, además de la detección y tratamiento de los individuos enfermos, se requiere de una profunda intervención de carácter preventivo. Actualmente se dispone de las evidencias científicas sobre los factores de riesgo responsables del desarrollo de la diabetes. Las experiencias internacionales sobre los beneficios para la salud pública son prueba de la importancia de la prevención primaria. (FID 2015)

En los últimos diez años, varios ensayos clínicos han sido publicados con respecto al tratamiento de la prediabetes con la finalidad de investigar la efectividad de estos tratamientos en retardar o abrogar la progresión de la prediabetes a diabetes manifiesta. En forma general, los estudios arrojan datos optimistas y permiten establecer que:

- 1) Los cambios en el estilo de vida son altamente efectivos en retardar la progresión de la prediabetes a diabetes
- 2) Los agentes farmacológicos que aumentan la sensibilidad a la insulina (metformina, glitazonas) o que impiden la absorción de carbohidratos (Acarbosa) también confieren un efecto de retardo en la progresión de prediabetes a diabetes. (FID 2015)

De acuerdo a las evidencias se establece que la modificación en el estilo de vida de los individuos representa la primera alternativa de selección para la prevención de la Diabetes Mellitus, resultando la piedra angular tanto para el tratamiento como para

la prevención de la DMT2. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido los factores del estilo de vida que tienen evidencia comprobada para prevenir la progresión hacia diabetes tipo 2, los cuales se presentan en la Tabla 3. (FID 2015)

<b>Tabla 3. Evidencia sobre prevención del progreso hacia la diabetes (FID 2015)</b>	
<b>Evidencia</b>	Disminuyen el riesgo
<b>Convincente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de peso en personas con sobrepeso</li> <li>• Aumento de actividad física</li> </ul>
<b>Probable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibra dietética</li> </ul>
<b>Posible</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos grasos n-3</li> <li>• Alimentos con bajo índice glucémico</li> </ul>
<b>Insuficiente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamina E</li> <li>• Cromo</li> <li>• Magnesio</li> <li>• Consumo moderado de alcohol</li> </ul>

### **3.10 CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO**

En la actualidad existen métodos para detectar tanto a la prediabetes como a la diabetes. La prueba más conocida del tipo estímulo-respuesta es la Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral (CTGO). Esta es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa, de manera que, en los sujetos con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, esta capacidad se encuentra alterada, y en el caso particular de los sujetos con (DMT2), esta capacidad se encuentra disminuida. (Trujillo 2007)

En la CTGO se obtiene una muestra de sangre en ayunas para determinar la glucemia tras un ayuno de 8 a 10 hr. Si el valor de glucemia en ayunas es igual o mayor a 126 mg/dl, se diagnostica Diabetes Mellitus y no se realiza la prueba pues este valor es suficiente para el diagnóstico. Si la glucemia en ayunas es menor de 126 mg/dl, entonces se le administra al paciente una carga de glucosa, (75 gramos de glucosa disueltos en 250 miligramos de agua). Posteriormente, se toman muestras de sangre a intervalos regulares de tiempo, de acuerdo con alguno de los muestreos convencionales: una muestra cada 15, 30 o 60 minutos hasta las 2 horas. Si la glucemia en la muestra de las dos horas es igual o superior a los 200 mg/dl, se diagnostica DMT2. Finalmente, con los valores de concentración de glucosa y tiempo obtenidos, se dibuja una gráfica que generalmente se representa como una curva. Ver Figura 3.1. (Trujillo 2007)

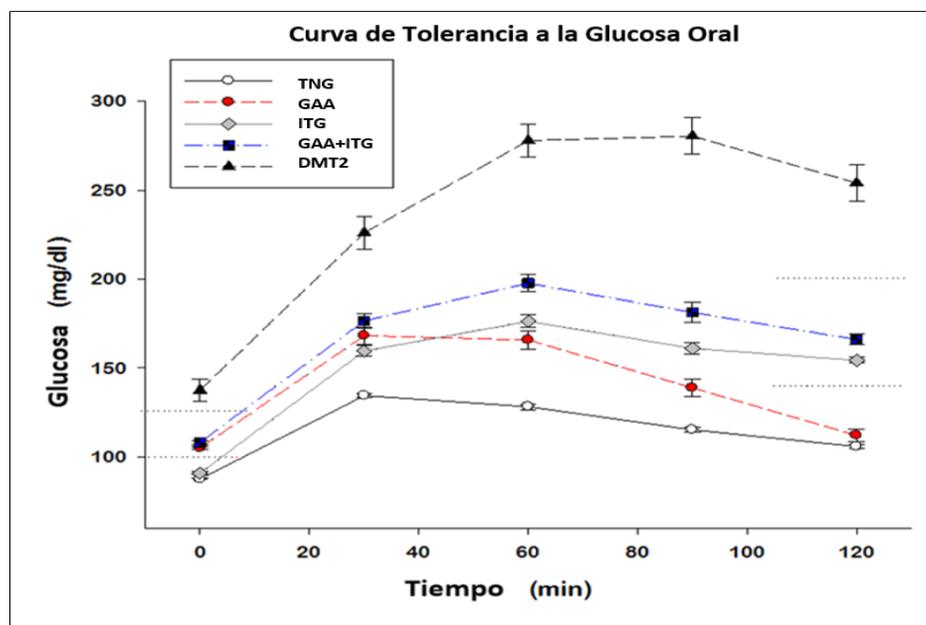


Figura 3.1 Valores nominales en la Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral. TNG: Tolerante Normal a la Glucosa, GAA: Glucosa Alterada en Ayuno, ITC: Intolerante a los carbohidratos, GAA+ITG: Glucosa Alterada en Ayuno +Intolerante a la glucosa, DMT2: con Diabetes Mellitus tipo 2. Monroy (Datos sin publicar)

Otros criterios para el diagnóstico de la prediabetes y diabetes, es por medio de la concentración de la glucosa en sangre después de 8 a 10 h de ayuno, y mediante la determinación de hemoglobina glucosilada, los valores de estas medidas, de acuerdo a la ADA, OMS y la NOM-015 de la SSA de México, se presentan en la Tabla 4.

<b>Tabla 4. Criterios diagnósticos de Diabetes Mellitus (Inzucchi 2012;NOM-015 2010; ADA 2016)</b>									
Organismo	Asociación Americana de Diabetes				Organización Mundial de la Salud		NOM 015 SSA		
	TNG	ITG	GAA	Diabetes	Pre-diabetes	Diabetes	ITG	GAA	Diabetes
Medición Plasmática en sangre venosa									
Glucosa en ayuno (mg/dl)	<100		100-125	≥ 126	110-125	≥ 126		100 – 125	≥ 126
Glucosa a las 2 h de CTOG (mg/dl)	<140	140-199		≥ 200	140-199	≥ 200	140 - 199		≥ 200
Glucosa casual (mg/dl)	<140			≥ 200		≥ 200			≥ 200
Hemoglobina glucosilada (%)	<5.7	5.7-6.4		≥ 6.5		≥ 6.5			

### **3.11 ACTUALIDAD DE LAS INVESTIGACIONES EN DMT2**

Aplicar el análisis diagnóstico basado en el análisis de aliento es un objetivo actual. Entre las diversas bondades de este diagnóstico sobresale su metodología no invasiva, presentando grandes ventajas por sobre los métodos de diagnósticos tradicionales.

Múltiples estudios se han dedicado a encontrar relaciones significativas de COVs propios de la diabetes. Existen numerosas investigaciones donde el metabolito más estudiado resulta ser la acetona. La razón fisiológica es que la acetona es parte de los tres cuerpos cetónicos producidos en el hígado como una fuente de energía alternativa cuando la glucosa no se encuentra disponible. Personas que presentan ayuno o realizan ejercicio prolongado tenderán a tener bajos niveles de glucosa sanguínea y por tanto tendrán niveles de cetona elevados en la sangre con un olor afrutado característico en el aliento. (Wang 2013)

Las personas que son diagnosticadas con diabetes no son capaces de usar la glucosa, ya sea por la carencia de insulina o resistencia a ésta, por lo que se acumula en el torrente sanguíneo presentando hiperglicemia. Por tanto, los cuerpos cetónicos se incrementan en respuesta al decremento energético y el hígado empieza a romper grasas produciendo los cuerpos cetónicos. (Wang 2013)

Se presume que la mejor técnica para un análisis preciso de la acetona en el aliento es el SIFT-MS (Amman, 2013). En esta investigación se encontró una correlación entre la glucosa sanguínea y la acetona en personas sanas, con la finalidad de aplicarlo a personas diabéticas. (Amman 2013, Walton 2014)

Otras investigaciones han llegado a analizar la acetona en 38 pacientes con DMT2 utilizando la selección de iones en tubo de flujo acoplado a espectrómetro de masas, que consiste en una técnica en tiempo real que ofrece una medición rápida, reproducible y de fácil realización de la concentración de acetona en pacientes ambulatorios con diabetes tipo 2. (Storer 2011)

Yan (2014) y colaboradores emplearon cromatografía de gases combinada con una aproximación metabolómica para identificar distintas marcas metabólicas de la DMT2. En el estudio referido, se realizó un estudio a 39 sujetos sanos y 48 sujetos con DMT2. Como potenciales biomarcadores se identificaron al Isopropanol, 2,3,4-trimetilhexano, 2,6,8-trimetildecano, tridecano, undecano, acetona, m-xileno y tolueno.

Dentro de las investigaciones más actuales, y como parte del mismo equipo de trabajo de esta tesis, se encuentra el estudio de 27 sujetos sanos y 8 sujetos diabéticos seleccionados de la población mexicana por Gallego (2016). En este estudio se empleó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Como resultado se logró determinar una línea basal de compuestos formada por 20 metabolitos de acuerdo a las diferencias significativas en los errores estándar de ambas poblaciones y dentro de un análisis de componentes principales de los metabolitos en

la población total, se mostró una clara correlación de 9 biomarcadores con la patología diabética de acuerdo a la literatura.

Los metabolitos que logró identificar, sin repetición, tanto en la línea basal, como en el análisis estadístico se muestran en la Tabla 5. Los metabolitos de esta tabla forman una parte fundamental en el desarrollo de esta tesis.

<b>Tabla 5. Metabolitos de la línea basal y ACP en personas con DMT2 (Gallego 2016)</b>	
<b>Peso por átomos de carbono</b>	<b>Metabolitos</b>
Muy Ligeros (C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> )	Etanol
	Butano
Ligeros (C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> )	Acetona
	Isopreno
	1-Propanol
	2-Butanona
	Butenona
Pesados (C <sub>7</sub> -C <sub>12</sub> )	Ciclohexano
	2-Pentanona
	3 Metilhexano
	1-Hepteno
	3-Metil 2-Butenal
	2-Etoxiethanol
	1-Pentanol
2-Hexanona	
2,3,5- Trimetilhexano	
p Xileno	
2,4,6-Trimetilheptano	
m Xileno (1,3 Dimetilbenzeno)	
2,2,6- Trimetiloctano	
Benzaldehido	
2,2,3,4-Tetrametilpentane	
2,3,3 Trimetiloctane	
2,6- Dimetildecane	
Limoneno	
Undecano	

### 3.12 MÉTODO DE ANALISIS DE ALIENTO EXHALADO

La cromatografía de gases es la técnica más común para el análisis de biomarcadores en el aliento exhalado. Esta técnica consiste en la inyección de una muestra de aire dentro de una columna cromatografía donde se lleva a cabo un proceso de separación fisico-química. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte a lo largo de la columna. Los compuestos químicos con diversas afinidades a la fase estacionaria se moverán a diferentes velocidades. Las velocidades producirán la separación de los compuestos. (Guiochon 1988)

De forma general las etapas del análisis cromatográfico se puede ver con el siguiente esquema (Guiochon 1988):

- Elección de la columna y fase estacionaria
- Ajuste de temperaturas
- Ajuste del caudal del gas portador
- Inyección de la muestra

- Vaporización de la muestra y arrastre hasta la columna
- Fijación de los componentes al inicio de la columna
- Desplazamiento de los componentes de la muestra a velocidades diferentes
- Los solutos salen de la columna, pasan al detector y se obtiene el cromatograma

Los parámetros que se eligen en el equipo de cromatografía de gases son:

- 1.- Tipo de gas portador
- 2.- Columna y dimensiones
  - 2.1.- Fase estacionaria
- 3.- Tipo de detector
- 4.- temperaturas en:
  - 4.1 Inyector
  - 4.2 Columna
  - 4.3 Detector

Los detectores que pueden ser empleados en el sistema son:

1.- El detector de ionización de flama (FID). Este es un detector de tipo destructivo el cual forma una llama que quema e ioniza los compuestos separados en la columna, es un detector insensible a los grupos funcionales como C=O, OH, NH que originan en la llama pocos iones, tiene una gran sensibilidad de  $10^{-3}$  g soluto/mL. (Guiochon 1988)

2.- El principio de un detector por espectrometría de masa (EM) consiste en que la muestra es fragmentada a través de bombardeos de electrones o iones, los iones formados se fragmentan, y estos fragmentos son separados magnéticamente por su relación carga-masa y finalmente son cuantificados por un proceso de adquisición de datos. (Guiochon 1988)

### **3.13 LOS MÉTODOS ACTUALES PARA DETECCIÓN DE COVs**

La cromatografía de gases, sigue siendo hasta ahora el método favorito para el análisis del aliento exhalado debido a su gran resolución y sensibilidad. Existen diversos acoplamientos de detectores en CG, entre ellos el acoplamiento con detectores de espectrometría de masas (GC-EM), con detección de ionización de flama (CG-DIF) y con espectrometría de movilidad iónica (GC-EMI). (Pereira 2014)

A pesar de la gran calidad de los resultados de la CG, resulta ser un método costoso, poco transportable y no puede ser ocupado en tiempo real.

Actualmente ya están disponibles opciones de análisis en tiempo real como la reacción de transferencia de protones (RTP) y sus variantes que incluyen la espectrometría de masas (RTP-EM), la reacción de transferencia de protones-tiempo de vuelo y la espectrometría de masa (RTP-TV-EM), la espectrometría de movilidad iónica

acoplada a columnas multicapilares (EMI/CM), la selección de iones en tubo de flujo con espectrometría de masas (SITF-EM). (Pereira 2014)

De manera reciente se han desarrollado una amplia gama de acercamientos y sensores de espectroscopia láser, comúnmente conocidos como narices electrónicas (*e-nose*), que se aplican al análisis del aliento exhalado con resultados prometedores. Estas opciones en tiempo real reducen varios pasos experimentales innecesarios relacionados con el muestreo, el almacenamiento y la preconcentración de las muestras. (Pereira 2014)

Como parte de estos desarrollos existen dispositivos denominados como punto de atención (POC por sus siglas en inglés de "point of care"), potencialmente baratos y de aplicación en tiempo real. Estos dispositivos son capaces de ofrecer alta sensibilidad y selectividad como la EM. Una de las ventajas más notables de estos dispositivos POC es que pueden ser utilizados en grandes estudios epidemiológicos. Sin embargo, se limitan a la caracterización de un número muy limitado de COV y su capacidad para identificar simultáneamente la amplia variación química de COVs en el aliento exhalado debe ser mejorada. (Pereira 2014)

Alternativamente, muchas narices electrónicas (*e-nose* en inglés) dependen del reconocimiento de patrones y caracterizan cualitativamente diferentes clases de COVs en comparación con los dispositivos que dan una cuantificación absoluta. (3)

Tanto para una caracterización cuantitativa como cualitativa, los COV deben ser identificados por metodologías integrales como la CG-EM. Desafortunadamente, estas metodologías integrales son muy costosas, requiriendo operadores altamente especializados y expertos. (Pereira 2014)

La búsqueda de una tecnología fiable para el análisis del aliento todavía está en progreso, ya que no existe una metodología única disponible para alcanzar la resolución de la CG-EM y en un enfoque en tiempo real usando un dispositivo de punto de atención asequible (POC) (Pereira 2014)

# CAPITULO 4: METODOLOGÍA

---

## 4.1 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES

Para este trabajo se contempló una población de 42 pacientes con dos repeticiones, cada uno, para el estudio de compuestos orgánicos presentes en el aliento.

Para lograr la caracterización fisiológica de estos sujetos se seleccionó a los participantes de una base de datos, del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", que cuenta con alrededor de 1400 participantes.

Actualmente esta base de datos sigue creciendo y su implementación se lleva a cabo bajo el protocolo "identificación de factores que predisponen a la diabetes mellitus tipo 2 en sujetos normoglicémicos con historia familiar de diabetes y su relación con obesidad" con número de oficio CE/011/417 ante el comité de ética del mismo hospital.

En este protocolo, a cargo de la Dra. Adriana Monroy Guzmán, se realiza una serie de pruebas hematológicas, revisión de antecedentes familiares y mediciones de parámetros fisiológicos. Los resultados de este protocolo recaen en una base de datos que contiene información del estado de salud de diversos sujetos. Dentro de las pruebas hematológicas se incluyen: la hemoglobina glucosilada, la curva de tolerancia a la glucosa, los factores inmunológicos, la biometría hemática, la urea, la creatinina, el ácido úrico, el colesterol, los triglicéridos, las lipoproteínas, la bilirrubina, la albúmina y múltiples proteínas. Los valores de referencia se presentan en la Tabla 6.

<b>Tabla 6. Valores de referencia para la clasificación de dislipidemias</b>			
Parámetro	Sano	Por encima de lo normal	Anormal
COLESTEROL (mg/dL)	50-199	200-239 Hipercolesterolemia	≥240 Hipercolesterolemia crónica
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	50-149	150-199 Hipertriglicemia	≥200 Hipertriglicemia crónica
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18-24.9 Recomendado	25-29.9 Sobrepeso	≥30 Obesidad

Para catalogar a los sujetos de los grupos de interés para este proyecto, de la base de datos, se consideró lo siguiente:

- Un grupo de control o sujetos sanos compuesto por 6 sujetos. donde se buscó que los sujetos sometidos al protocolo de la Dra. Monroy tuvieran

tanto ausencia de diabetes como de otras enfermedades. Además, que cada sujeto presentara valores nominales de las siguientes pruebas hematológicas: Curva de tolerancia a la glucosa oral, prueba de hemoglobina glucosilada y prueba de glucosa en ayuno.

Adicionalmente se consideró: el índice de masa corporal, los niveles de colesterol y de triglicéridos con valores normales. Estos valores se encuentran reportados por la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2016), la NOM-037 y la NOM-015 de la SSA. Tabla 4, Tabla 6.

- Un grupo de prediabéticos compuesto por 18 participantes donde se buscó que los sujetos sometidos al protocolo de la Dra. Monroy presentaran los valores establecidos por la NOM-015 de la Secretaría de Salud Pública y los valores reportados por la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2016) para aquellas personas con glucosa alterada en ayunas y con intolerancia a los carbohidratos. Esto se cuantifica llevando a cabo pruebas hematológicas que incluyen la obtención de la curva de tolerancia a la glucosa, prueba de hemoglobina glucosilada y prueba de glucosa en ayuno. Tabla 4.
- Un grupo de diabéticos compuesto por 12 participantes, donde se buscó que 6 de los sujetos sometidos al protocolo de la Dra. Monroy presenten los valores umbrales establecidos por la NOM-015 de la Secretaría de Salud Pública para sujetos con diabetes reciente. Para los otros 6 pacientes con diabetes de larga duración se buscó que rebasaran los valores umbrales de esta misma norma. La cuantificación de esos valores se llevó a cabo por medio de pruebas hematológicas: obtención de la curva de tolerancia a la glucosa, prueba de hemoglobina glucosilada y prueba de glucosa en ayuno. Tabla 4.
- Un grupo de diabéticos en estado crítico compuesto por 6 participantes que presentaron glicemia descontrolada y en estado de urgencia médica. A estos pacientes se les midió la glicemia capilar en Departamento de Urgencias del HGM.

## **4.2 MUESTREO DEL ALIENTO ALVEOLAR**

Las muestras de aliento fueron tomadas en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" en el departamento de neumología, bajo parámetros controlados de temperatura, presión barométrica y humedad relativa. Estos parámetros se obtuvieron del Pletismógrafo del consultorio VmaxE, 2009, Vyasis HealthCare, Yorba Linda, CA.

A los sujetos muestreados se les pidió un ayuno de 8 horas, no haber realizado ejercicio físico previo, presentarse sin lavado bucal con algún químico, sin perfumes, lociones, cremas faciales ni maquillaje.

Dado que el aliento humano consiste de una mezcla de aire de los alveolos y aire del espacio muerto, para que el análisis de aliento sea efectivo es deseable maximizar la cantidad de aire alveolar dado a la riqueza de metabolitos en él.

Para el presente trabajo, se colectó, con una bolsa Tedlar (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA) una primera muestra de 300 ml compuesta de la mezcla de aire del espacio muerto y aire de los alveolos. Esta primera muestra fue descartada con motivo de desalojar el aire del espacio muerto. El resto de la exhalación, la cual consistió en aliento alveolar, fue colectado en una segunda bolsa y la cual se utilizó para el análisis de metabolitos en el análisis cromatográfico.

Para remover la humedad de la muestra de aliento, se acopló, a las bolsas Tedlar, un tubo de Nafión que elimina el agua por medio de permeación. (Perma Pure 2017)

Después del procedimiento de muestreo del aliento, se midió el volumen del aliento alveolar en las bolsas Tedlar con el método de Arquímedes. Posteriormente se preconcentraron las muestras en cartuchos de adsorbentes. Para este fin, se conectó una bomba de vacío a los cartuchos adsorbentes, donde el contenido de la bolsa Tedlar fue adsorbido por el cartucho. Para ello, se utilizó un flujo de 120 ml / min.

Los cartuchos empleados consistieron en tubos de acero de 14.5 cm de longitud y diámetro de 0.5 cm, empacados con materiales adsorbentes de carbón grafitizado con el siguiente orden: 0.18g de Carbopack C, 0.125g de Carbopack B y 0.12g de Carbosieve SIII.

Los cartuchos, cargados con las muestras, fueron transferidos al Centro de Ciencias Atmosféricas, UNAM, MX. Los cartuchos fueron refrigerados a 4 °C y almacenados en un bote de acero lleno de carbón activado para su futuro análisis en CG- EM-DIF. El periodo de almacenaje fue de hasta 3 semanas.

Posterior a la colección de las muestras de aliento y desalojo de las muestras en los cartuchos, todas las bolsas fueron sanitizadas para remover contaminantes residuales y marcadas para la identificación de cada muestra

La limpieza de las bolsas se realizó enjuagando dos veces con aire zero y una vez con nitrógeno gaseoso 5.0 (Praxair Technology Inc., MX). En cada enjuague las bolsas fueron calentadas por 20 minutos a 80° C y vaciadas con una bomba de vacío. Este método fue desarrollado por Gallego (2016)

Para verificar la limpieza de las bolsas de muestreo, después del lavado, se vertió nitrógeno seco a una de estas bolsas y se analizó esta muestra en el cromatógrafo de gases antes de su uso para el proceso de segunda recolección de muestras.

Se tomó a los pacientes una segunda muestra de aliento a la semana de la primera. Los pacientes a quienes no se repitió esta prueba fue a los catalogados como diabéticos críticos, debido a su estado de emergencia médica. El periodo de toma de muestras de aliento fue de 3 meses.

### **4.3 ANÁLISIS POR CG-EM-DIF**

El análisis CG-EM-FID se realizó en un cromatógrafo de la marca Agilent Technologies mod. 7890A GC System. Este cromatógrafo de gases se acopló con espectrometría de masas (MS) Agilent 5975C y un detector por ionización de flama (DIF).

En la Tabla 7 se muestran las condiciones para la adquisición de los cromatogramas del CG-EM-DIF.

Se utilizó el sistema de procesamiento de datos, ChemStation, Agilent, revisión E.02.00,2008, propio del equipo, el cual contaba con la librería NIST, revisión D.05.02, 2005, para la identificación de analitos.

En este sistema se analizaron las señales del espectrómetro de masas (EM) y del detector de ionización de flama para todos los compuestos de la Tabla 5.

De manera cualitativa, para la identificación de los analitos en el equipo, se consideraron los tiempos de retención, encontrados por Gallego (2016) y el espectro de masas de los compuestos de interés. Se considera como tiempo de retención al tiempo que tarda en ser detectado un compuesto de interés después de la inyección de una muestra en el CG, donde el tiempo de retención es característico de cada compuesto.

Para la identificación absoluta de los compuestos, se inyectaron los estándares de la tabla 8, con la finalidad de obtener los tiempos de retención del equipo.

Posterior a la inyección de los cartuchos con muestras de aliento en el CG-EM-DIF, cada cartucho fue nuevamente termodesorbido a 350° C, con un flujo de nitrógeno gaseoso por 3 horas, con la finalidad de limpiarlo y reutilizarlo para futuros muestreos.

<b>Tabla 7. Parámetros cromatográficos del análisis</b>			
<b>TERMODESORCIÓN DEL CARTUCHO</b>		<b>COLUMNAS CROMATOGRÁFICA</b>	
Temperatura	330 °C	Columna capilar EM	100% DIMETIL POLISILOXANO (60m, 0.25mm, 1 um), no polar
Tiempo	8 min	Columna capilar FID	HP-PLOT/Q (30 m, 0.32 mm, 20 um)
		Gas portador y flujo	He 1 ml/min
<b>CRIOENFOQUE EN EL PTV</b>		Programa de temperatura	-20 °C (1.6 min)/5 °Cmin <sup>-1</sup> /260 °C (5 min)
Trampa de crioenfoco	Inyector PTV empacado con Carbotrap C	<b>ESPECTRO DE MASAS</b>	
Temperatura inicial	-20 °C	Modo de adquisición	SCAN/SIM
Temperatura final	350 °C	Modo de ionización	Impacto Electrónico
Tiempo	1.6 min	Energía de ionización	70 eV
Flujo	1 ml/min	Barrido de masas y velocidad del escaneo	Escaneo completo de 35-200 uma, 4.3 escaneados/seg
<b>DETECTOR POR IONIZACIÓN DE FLAMA (DIF)</b>		Temperatura fuente iónica / Temperatura línea de transferencia	230 °C / 270 °C
Flujos	aire: 450 ml/min hidrógeno: 40 ml/min nitrógeno: 20 ml/min	Temperatura cuadrupolo	150 °C

#### 4.4 ANÁLISIS CUALITATIVO

Para el análisis cualitativo, se tomó el área bajo la curva (ABC) de cada compuesto de cada muestra y se realizó una gráfica de barras de los 6 grupos de estudio para observar las diferencias entre ellos. Para las muestras con segunda repetición, se realizó un promedio de la señal para cada compuesto.

Se tomó el error estándar para cada compuesto por grupo de estudio para demostrar que el contraste entre compuestos por grupo era significativo. Ec. 4

$$S_x = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde S es la desviación estándar del compuesto y N es el número de sujetos del grupo muestreado.

## 4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.5.1 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El objetivo de un análisis de componentes principales (ACP) es reducir un gran número de variables dependientes, a un conjunto menor e independiente para explicar el fenómeno de interés. Además, el aplicar ACP se logra clasificar y/o agrupar a los sujetos estudiados, basándose en características medidas.

Este tipo de análisis aumenta el poder de interpretación otorgando un sentido de orden a los datos y al mismo tiempo minimiza la pérdida de información.

Para lograr la reducción de variables, el ACP crea nuevas variables no correlacionadas que sucesivamente maximizan la varianza.

Al encontrar estas nuevas variables, las componentes principales se reducen a resolver un problema de eigenvalores o eigenvectores, y donde las nuevas variables están definidas por el conjunto de datos utilizado. (Jolliffe 2002)

Se aplicó ACP a la serie de datos cromatográficos obtenidos en el capítulo 4.4 para los grupos de interés: sanos y prediabéticos, sanos y diabéticos, y el conjunto de los 6 grupos de estudio.

Asimismo, para realizar el estudio de ACP, se utilizó el software R versión 3.2.4 2016, de The R foundation for statistical computing y la librería FactoMineR. (Le 2008)

### 4.5.2 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Para realizar el análisis descriptivo e identificar si existían casos atípicos y/o extremos en cada uno de los 6 grupos estudiados, se realizaron diagramas de cajas y bigotes para cada uno de los compuestos estudiados.

Este tipo de diagramas son una herramienta gráfica conveniente en el análisis descriptivo para mostrar un grupo de datos numéricos a través de sus medianas, promedios, cuartiles y observaciones mínimas y máximas. Se puede mostrar la distribución de datos, examinar la simetría e indicar posibles valores atípicos. (College of Saint Benedict and Saint John's University 2017; Li 2012)

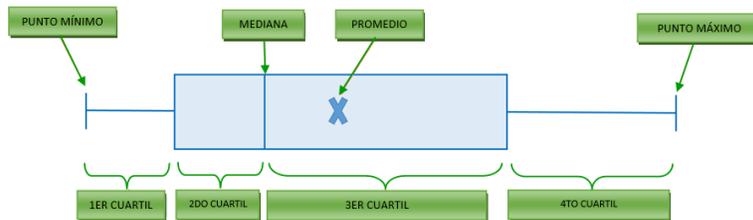


Figura 4.1 Composición de una gráfica de cajas y bigotes.

### 4.5.3 ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) es un procedimiento estadístico utilizado para probar el grado en el que dos o más grupos varían o difieren en un experimento. Una gran varianza (o diferencia) por lo general indica que hubo un hallazgo significativo de la investigación. (Universidad de Barcelona 2017)

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de  $N$  poblaciones ( $N > 2$ ) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de  $n$  factores con respecto a la variable dependiente o de interés. (Universidad de Barcelona 2017)

Al aplicar ANOVA de una vía se calcula un estadístico denominado  $F$ . Si las medias entre los grupos varían mucho y la media dentro de un grupo varía poco, es decir, si los grupos son heterogéneos entre ellos y similares internamente, el valor de  $F$  será más alto, y, por tanto, las variables estarán relacionadas. Por tanto, en cuanto más difieren las medias de la variable dependiente entre los grupos de la variable independiente, más alto será el valor de  $F$ .

El análisis ANOVA de una vía fue aplicado a los 6 diferentes grupos de estudio con la finalidad de probar si el contraste entre estos grupos era significativo para algún compuesto de interés.

## 4.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO

### 4.6.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

La composición cuantitativa de una mezcla puede ser obtenida a partir de una relación lineal o cuadrática de una concentración conocida del compuesto de interés y el área del pico del compuesto de interés. (TO-01 1984)

Para este procedimiento se requiere obtener curvas de calibración que relacione concentraciones conocidas del compuesto y el área de la señal del CG-EM-FID. Para este fin se emplearon mezclas gaseosas de estándares gravimétricos, a partir de los compuestos en forma gaseosa o líquida.

Se realizó el procedimiento de dilución estática descrito en los métodos TO-01 (1984) y TO-17 (1999) de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA) para los compuestos en estado líquido con la finalidad de obtener una mezcla gaseosa. En este método se considera la corrección por temperatura y presión para que los resultados se presente en condiciones estándar. (TO-15 1999)

Los estándares utilizados se presentan en la Tabla 8.

<b>Tabla 8. Estándares gravimétricos empleados para realizar las curvas de calibración</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Estado</b>	<b>Marca y no. de serie</b>
<i>Etanol</i>	Líquido	J.T. Baker 9014-03, 4L
<i>Butano</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde, a 1 ppm
<i>Acetona</i>	Líquido	J.T. Baker, 9006-03, 4L
<i>Isopreno</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde a 1 ppm Fluka, BCBN7519V, 1 mL
<i>2-Butanona</i>	Líquido	Sigma Aldrich 02469 5ml, BCBP9263V
<i>Ciclohexano</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde a 1 ppm
<i>2-Pentanone</i>	Líquido	Sigma Aldrich 46211-5ml, SZBF079XV
<i>2-Ethoxietanol</i>	Líquido	Sigma Aldrich 79109-1ml, BCBQ4793V
<i>1-Pentanol</i>	Líquido	Sigma Aldrich 77597-1ml, BCBP3806V
<i>2-Hexanona</i>	Líquido	Sigma Aldrich 02473-5ml, BCBR3966V
<i>p Xileno</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde a 1 ppm
<i>m Xileno</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde a 1 ppm
<i>Benzaldehido</i>	Líquido	CHEM, 0-239, 232-105 <sup>a</sup>
<i>Limoneno</i>	Líquido	Sigma Aldrich, L-2129-100 mL, 128H3405
<i>Undecano</i>	Gaseoso	Spectra Voc Standards U.S. EPA PAMS, Linde a 1 ppm

Tanto la mezcla gaseosa en el bulbo de dilución estática y los gases en la bala gaseosa (Spectra Voc Standards) fueron inyectadas en el CG-EM-DIF con 3 a 4 diferentes concentraciones siguiendo el método TO-01 de la EPA. En este método, se realiza un ajuste lineal siguiendo la Ec. 5, donde  $Y_N$  es la señal del compuesto de interés,  $x$  es la cantidad del compuesto de interés en nanogramos por el volumen muestreado,  $A$  y  $B$  son los coeficientes de la ecuación o factores de respuesta. (TO-17 1999)

$$Y_N = A + Bx \quad \text{Ec. 5}$$

#### 4.6.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LAS MUESTRAS DE ALIENTO

Para cuantificar los compuestos de la Tabla 8, se aplicó la Ec. 6 para cuantificar al compuesto de interés.

$$X_c = \frac{Y_c - A}{B} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde  $X_c$  es la cantidad del compuesto de interés en nanogramos por volumen muestreado,  $Y_c$  es la señal del compuesto de interés, A y B son los coeficientes calculados en la Ec. 6. (TO-01 1984; TO-17 1999)

La concentración de un compuesto en CG generalmente se expresa en partes por billón volumétricas. La conversión se realiza utilizando la Ec. 7, bajo las condiciones de presión, P, y temperatura, T, deseadas. (Raña 2017)

$$N[ppb_v] = C \left[ \frac{\mu g}{m^3} \right] * \frac{RT}{P} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde C es la concentración del compuesto de interés, M es la masa molecular del compuesto de interés y R es la constante de los gases ideales.

# CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES

Para este estudio se obtuvieron 38 muestras de aliento de diferentes sujetos, los cuales describieron a 6 grupos de estudio:

- A) Normoglicémicos o con Tolerancia Normal a la Glucosa (TNG)
- B) Intolerantes a la Glucosa (ITG)
- C) Glucosa Alterada en Ayuno + Intolerantes a la Glucosa (GAA+ITG)
- D) Recién diagnosticados con Diabetes Mellitus tipo 2 (RDMT2)
- E) Diabetes Mellitus de larga duración (DMT2)
- F) Diabetes Mellitus en estado crítico (CDMT2)

Se lograron obtener 23 repeticiones a la semana de la primera toma de muestra de aliento.

Para los sujetos con diabetes en estado crítico no se tomó ninguna repetición por su estado de emergencia médica.

En total se obtuvieron 61 muestras de aliento para los 6 grupos de estudio.

Inicialmente se había considerado estudiar 7 grupos, el cual incluía a sujetos prediabéticos con Glucosa Alterada en Ayuno (GAA), pero durante el periodo de muestreo no se presentó ningún paciente que reuniera los valores establecidos para ser considerado.

En la Tabla 9 se muestra un resumen de los parámetros de interés de los 6 grupos muestreados.

Tabla 9. PARÁMETROS DE INTERÉS DE LA POBLACIÓN MUESTREADA						
GRUPO	TNG	ITG	GAA+ITG	RDMT2	DMT2	CDMT2
SEXO	3H 5M	1H 8M	2H 4M	0H 4M	2H 3M	3H 3M
EDAD	36 ± 11	48 ± 7	48 ± 7	55 ± 9	54 ± 13	54 ± 12
IMC	25±4	28±3	36±4	32±8	30±7	NA
GLUCOSA PROMEDIO	108±14	156±16	168±30	197±12	336±69	288±88
TRIGLICERIDOS	95±31	147±67	237±80	143±36	201±124	NA
COLESTEROL	179±27	210±32	194±44	201±63	233±83	NA
CODIGO DE IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES	P4,P8,P10, P20,P21, P27,P30, P31	P1,P2,P5,P6, P12,P14,P16, P24,P28	P3,P22,P23 ,P25, P26, P32	P7,P9,P 17,P29	P11,P13,P 15,P18,P1 9	P33,P34,P35, P36,P37,P38

En las figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 y 5.7 se muestran visualmente los resultados de las pruebas fisiológicas y hematológicas de los pacientes muestreados.

En la Figura 5.1 se muestra la glucosa promedio en sangre y la glucosa casual de todos los sujetos muestreados. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para la glucosa casual. El primer nivel, es el valor normal de la glucosa casual, el segundo nivel son los valores por encima de lo normal y el tercer nivel son los valores anormales donde se presenta hiperglicemia crónica. La prueba de glucosa casual fue la única que se pudo tomar a los pacientes en estado de diabetes crítico, debido a su condición de emergencia médica.

Los valores de glucosa promedio fueron obtenidos para los sujetos en los grupos: TNG, ITG, GAA+ITG, RDMT2 y DMT2. Cabe destacar que, en la actualidad, no hay un valor de referencia para determinar la normalidad en la glucosa promedio.

En esta misma figura se ve una clara tendencia al aumento del valor de la glucosa promedio y glucosa casual del grupo en un estado normoglicémico a los grupos donde ya se presenta una diabetes diagnosticada.

Para un caso confirmado de diabetes, se emplea un valor de glucosa casual en sangre mayor que 200 mg/dL.

#### GLUCOSA PROMEDIO Y GLUCOSA CASUAL EN SANGRE

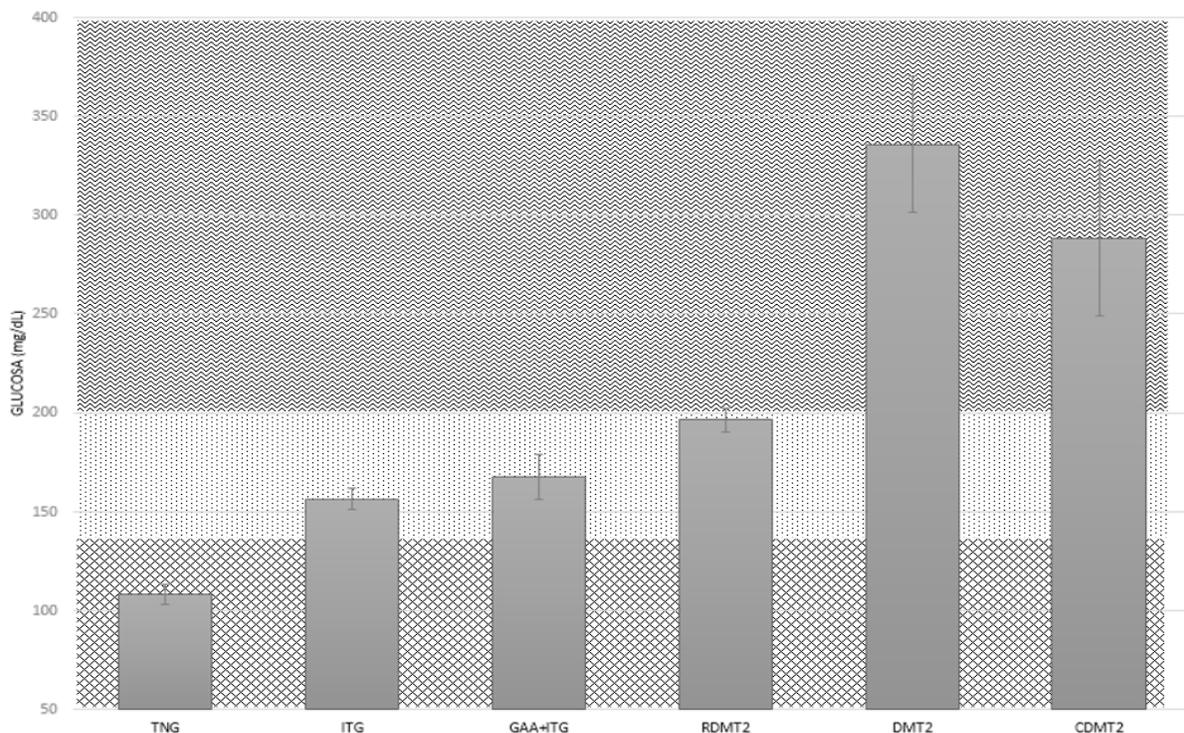


Figura 5.1 Glucosa promedio y glucosa casual en sangre. En la gráfica se presentan los valores promedio y el error estándar para cada grupo muestreado en este trabajo (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2, CDMT2).

En la Figura 5.25.2 se muestra la Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral de 5 grupos de estudio. En esta figura es posible distinguir por colores a los grupos. En verde el grupo

TNG, en amarillo el grupo ITG, en gris el grupo GAA+ITG, en naranja el grupo RDMT2, en azul el grupo DMT2.

Se puede observar como es la respuesta de cada grupo a la ingesta de glucosa cada 30 min por un lapso de 2 h. Además, representa un resumen visual para las pruebas de glucosa en ayuno y glucosa postprandial en conjunto.

Los valores nominales para un sujeto TNG es que, en ayunas, el individuo presente un valor menor que 100 mg/dL de glucosa en sangre, posteriormente suben los niveles de glucosa en sangre, pero a las 2 h de la ingesta, los valores de glucosa deben ser menores a 140 mg/dL. Los valores que se encuentran por encima de los valores la curva de un sujeto con TNG, y dependiendo el valor puede diagnosticar prediabetes o diabetes según los valores de referencia de la Tabla 4.

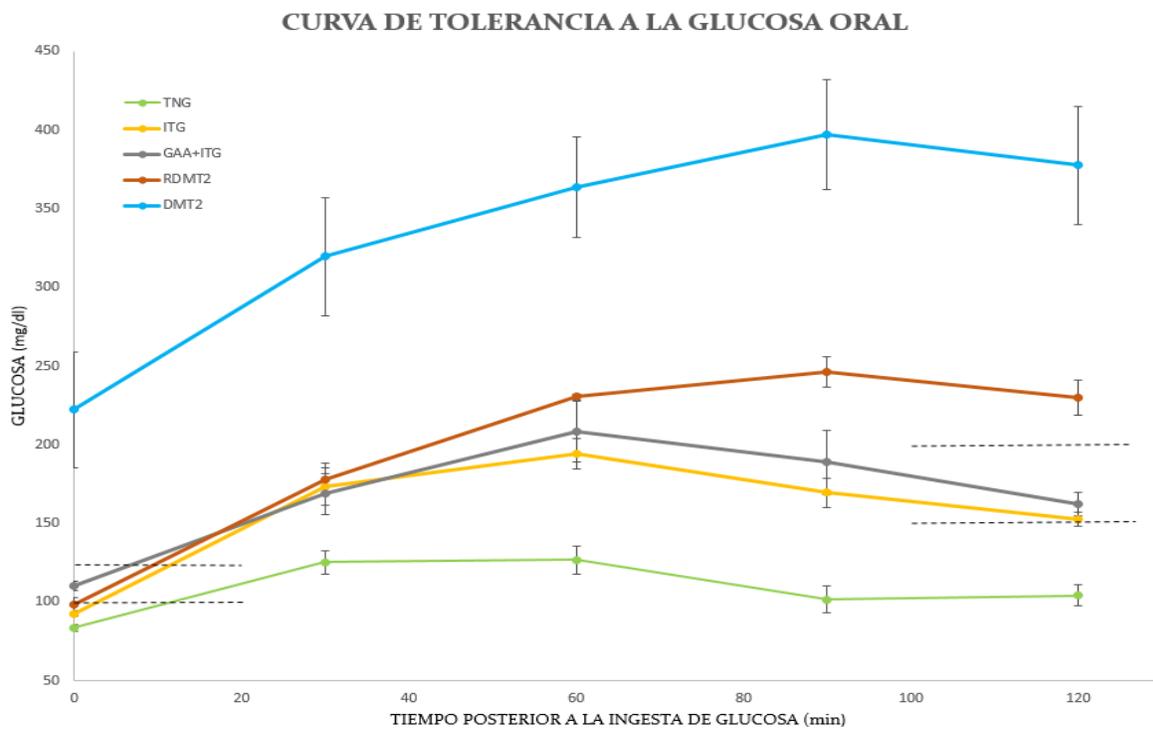


Figura 5.2 Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral. En la gráfica se presenta el promedio de los valores de la CTGO y el error estándar para 5 de los grupos muestreado. En verde el grupo TNG, en amarillo el grupo ITG, en gris el grupo GAA+ITG, en naranja el grupo RDMT2, en azul el grupo DMT2.

La Figura 5.3 muestra la glucosa en ayuno de 5 de los grupos muestreados. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para la glucosa en ayuno. El primer nivel, es el valor normal de la glucosa en ayuno, el segundo nivel son los valores por encima de lo normal y el tercer nivel son los valores anormales donde se presenta hiperglicemia crónica.

Se puede observar que el grupo NGT muestran valores normales para esta prueba, al igual que el grupo ITG (condición que se diagnostica con glucosa

postprandial). El grupo GAA+ITG muestra un valor por encima de lo normal, característico de su tipo de condición prediabética. El grupo con un diagnóstico reciente de diabetes (RDMT2), presenta valores ligeramente por encima de los normales de esta prueba. Todos los pacientes con DMT2 presentaron los valores establecidos para ser considerados como tal de acuerdo a la NOM-015 de la SSA y la Tabla 4.

**GLUCOSA EN AYUNO**

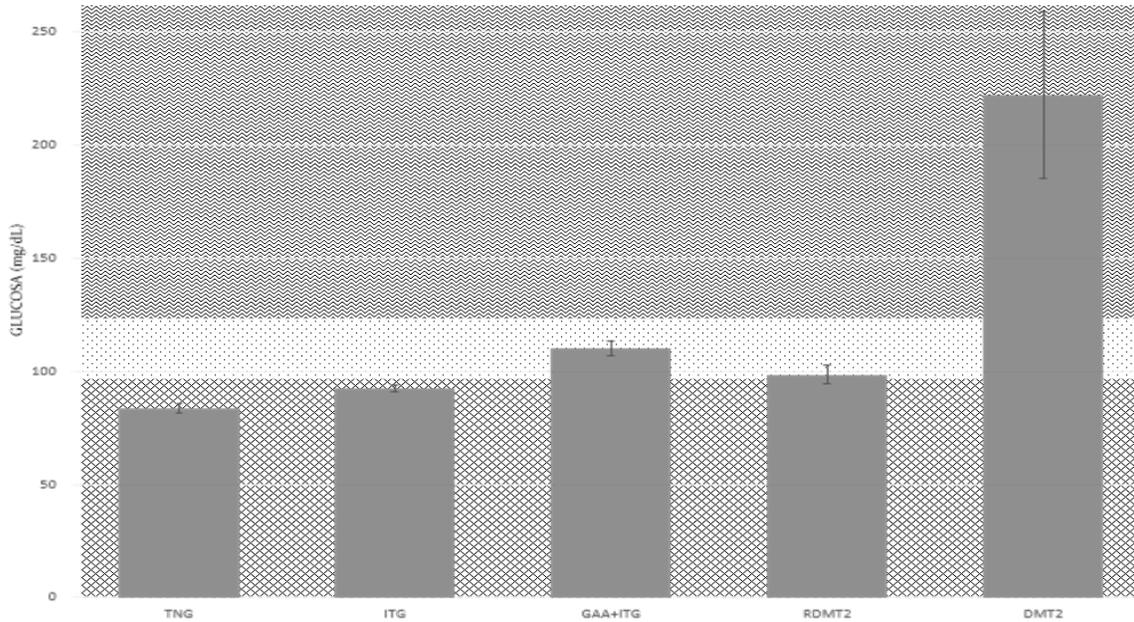


Figura 5.3 Glucosa en ayuno. En el gráfico se presenta el valor promedio y el error estándar de la glucosa en ayuno para cada uno de los 5 grupos de estudio (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2).

La Figura 5.4 muestra los valores de la Hemoglobina Glucosilada de 5 de los grupos de estudio. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para la hemoglobina glucosilada. El primer nivel, es el valor normal de la hemoglobina glucosilada, el segundo nivel son los valores por encima de lo normal y el tercer nivel son los valores anormales donde se presenta hiperglicemia crónica.

Se puede observar que el grupo TNG muestra valores normales, los grupos prediabéticos y diabéticos recientes muestran valores por encima de lo normal. El grupo con diabetes de larga duración muestra valores anormales que entran en el criterio de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) para el diagnóstico de diabetes. Tabla 4

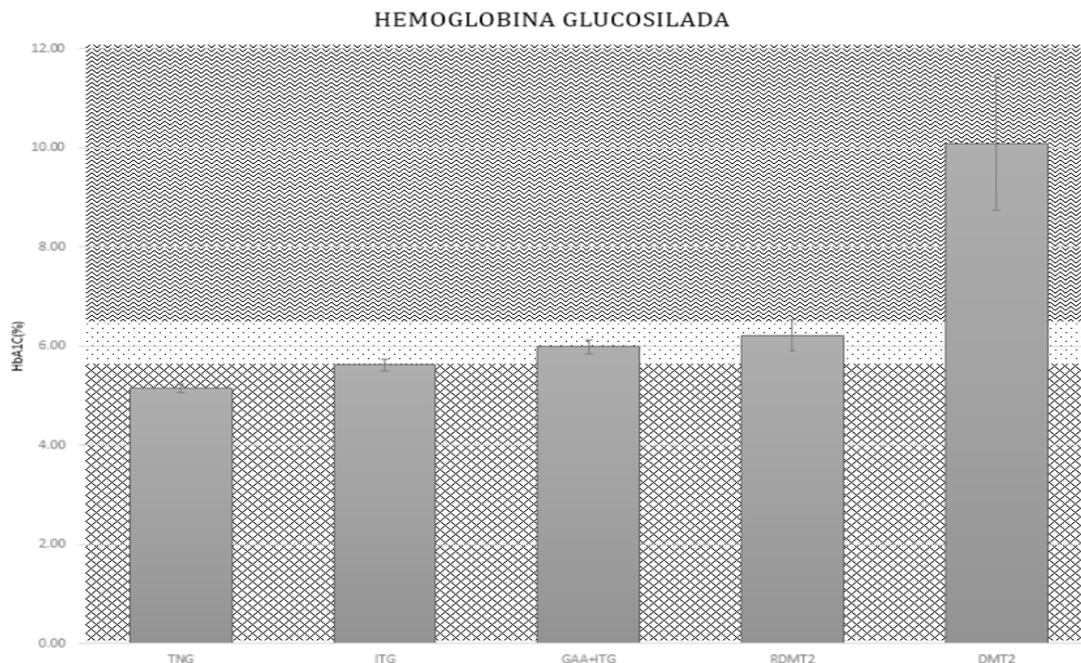


Figura 5.4 Hemoglobina glucosilada. En el gráfico se presenta el valor promedio y el error estándar de la hemoglobina glucosilada para cada uno de los 5 grupos de estudio (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2).

Las Figuras 5.5, 5.6 y 5.7 muestran los valores de otros parámetros fisiológicos para tomar criterios de como discriminar entre sujetos sanos y/o normoglicémicos. También se muestran los valores, para los otros grupos de estudio. Esto muestra que, para los sujetos identificados con prediabetes y diabetes, éstos presentan otras condiciones de enfermedad, principalmente dislipidemias, además de la condición metabólica estudiada en este trabajo.

La Figura 5.5 muestra los valores del índice de masa corporal de 5 de los grupos de estudio. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para este índice. El primer nivel, es el valor recomendado del IMC, el segundo nivel son los valores que establecen sobrepeso y el tercer nivel son los valores que establecen obesidad.

En la Figura 5.5 se observó que la población muestreada padecía mayormente de sobrepeso y obesidad. Incluso en el grupo de control (TNG), una fracción de ellos presentaba sobrepeso.

### INDICE DE MASA CORPORAL

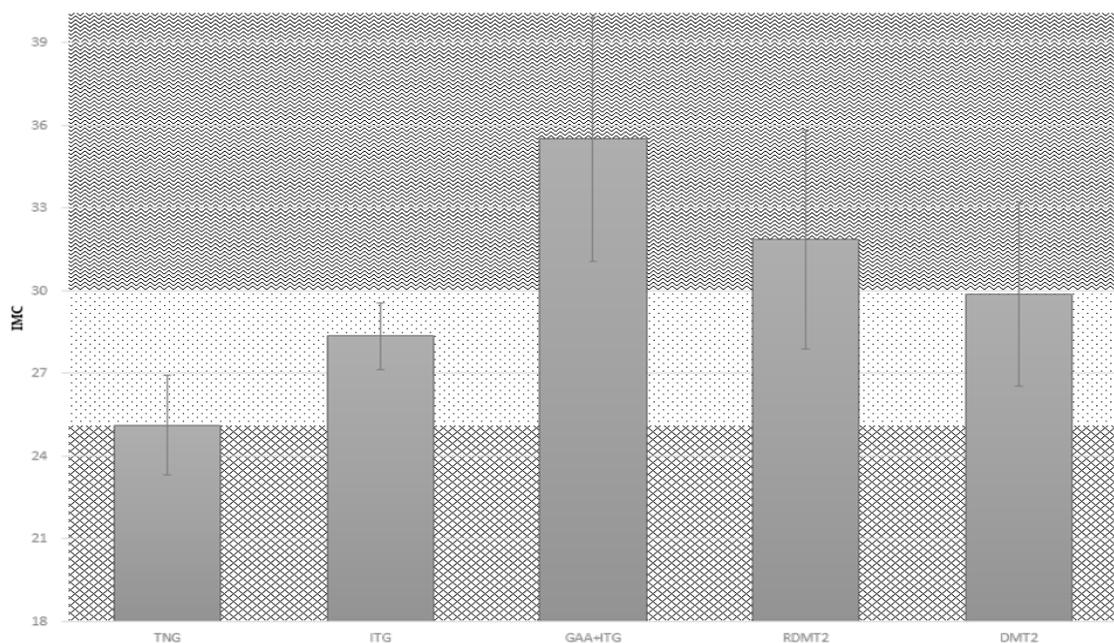


Figura 5.5. Índice de masa corporal (IMC). En el gráfico se presenta el valor promedio y el error estándar del índice de masa corporal para cada uno de los 5 grupos de estudio (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2).

La **Figura 5.6** muestra los valores de triglicéridos de 5 de los grupos de estudio. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para esta dislipidemia. El primer nivel, es el valor normal, el segundo nivel son los valores por encima de lo normal y el tercer nivel establece hipertrigliceridemia crónica.

Se observa que el grupo TNG tiene valores normales, mientras que los grupos ITG y RDMT2 se encuentran muy cercanos al límite superior de la normalidad. Los grupos GAA+ITG y DMT2 presentan valores de hipertrigliceridemia crónica.

## TRIGLICERIDOS

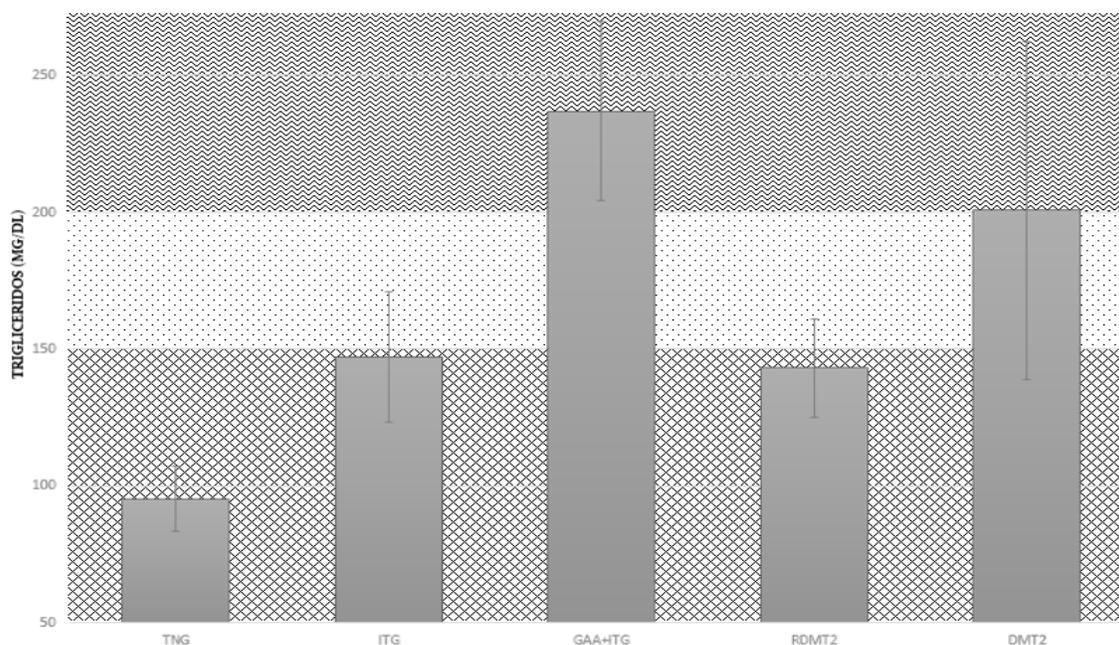


Figura 5.6 Triglicéridos. En el gráfico se presenta el valor promedio y el error estándar de los triglicéridos para cada uno de los 5 grupos de este estudio (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2).

La Figura 5.7 muestra los valores de colesterol en sangre de 5 de los grupos de estudio. De fondo a la gráfica se pueden observar los valores de referencia para esta dislipidemia. El primer nivel, es el valor normal, el segundo nivel son los valores por encima de lo normal y el tercer nivel establece hipercolesterolemia crónica.

En esta figura es posible observar que el grupo TNG tiene valores normales, mientras que los grupos ITG, GAA+ITG, RDMT2 y DMT2 presentan valores por encima de lo normal para esta dislipidemia.

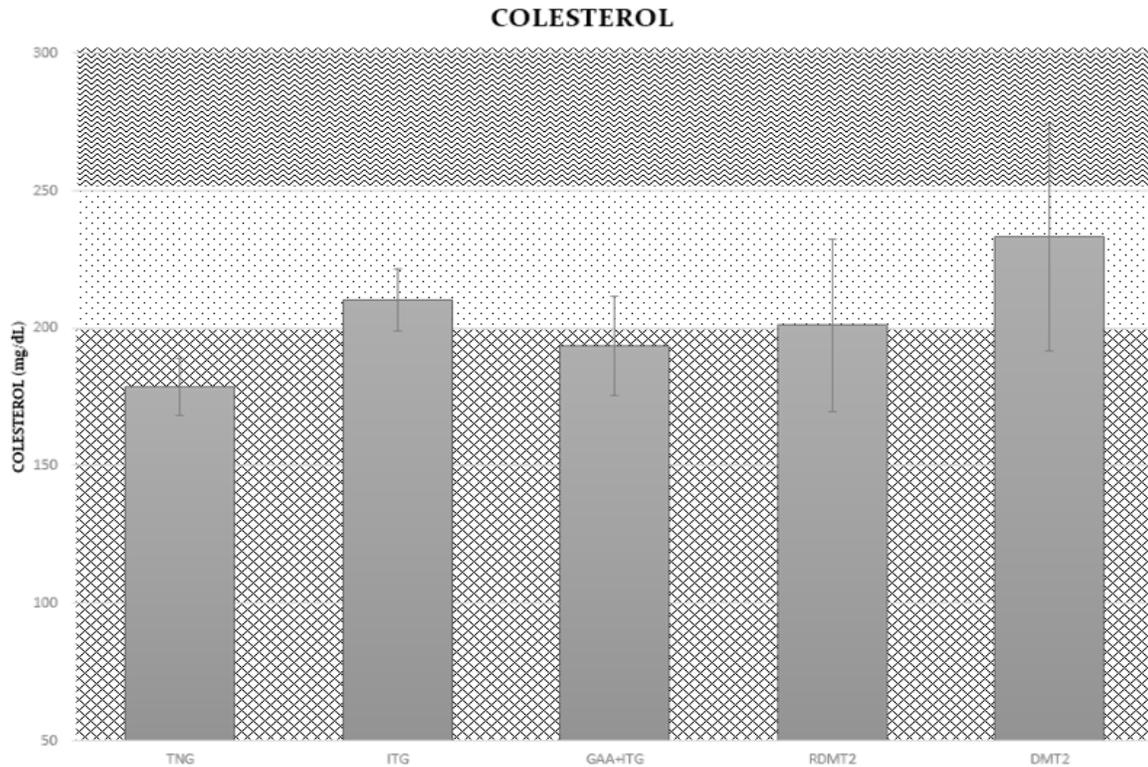


Figura 5.7 Colesterol. En el gráfico se presenta el valor promedio y el error estándar del colesterol para cada uno de los 5 grupos de este estudio (TNG, ITG, ITG+GAA, RDMT2, DMT2).

El realizar la mayoría de pruebas que involucra niveles de glucosa en sangre permitió la correcta diferenciación y diagnóstico de pacientes normoglicémicos, prediabéticos y diabéticos. Este fue considerado el paso principal para poder hacer correctamente la toma de muestras de aliento.

La identificación de otros parámetros en los sujetos de estudio, como el IMC, colesterol y triglicéridos, permitió saber si los sujetos muestreados, en el caso del grupo TNG, eran sujetos completamente sanos (sin ninguna otra enfermedad como obesidad o alguna dislipidemia) o si el grupo de estudio era normoglicémico. Se observó que no todos los sujetos en el grupo TNG eran sanos. Más adelante en el análisis de ACP se observa que los pacientes P10 y P20, que son pacientes normoglicémicos y no sanos, son ubicados en un cuadrante diferente respecto a la ubicación promedio de los sujetos de control.

Para los otros grupos de estudio, se observó que algunos pacientes muestreados además de prediabetes o diabetes, presentaban alguna condición relacionada con dislipidemias y/o obesidad. Pero la presencia de las dislipidemias no afectó el análisis de este trabajo.

## **5.2 MUESTREO DEL ALIENTO ALVEOLAR**

En el proceso de toma de muestras de aliento alveolar, se logró aplicar correctamente el protocolo hecho en el estudio previo de Gallego (2016).

Se logró muestrear a 38 pacientes. En el consultorio de neumología del Hospital General de México se tomaron las muestras de 32 pacientes, a quienes se les realizaron todas las pruebas hematológicas. En el departamento de Urgencias se tomó una única muestra a 6 pacientes en estado crítico.

De los 32 pacientes, solamente a 23, se les realizó una repetición de toma de muestra una semana después de tomar la primera muestra, debido a la dificultad de lograr que los pacientes regresaran a dar muestras.

El volumen medido de las muestras en las bolsas Tedlar siempre fue de  $1.000 \pm 0.005L$ , por el método de Arquímedes.

Las condiciones ambientales promedio medidas en el consultorio donde se tomaron las muestras de aliento fueron  $584 \pm 2$  mmHg para la presión y  $21 \pm 1$  °C para la temperatura.

## **5.3 ANÁLISIS POR CG-EM-DIF**

Con el análisis por CG-EM-DIF de las muestras de aliento, se obtuvieron los cromatogramas de cada uno de los pacientes.

Para cada paciente se obtuvo un cromatograma en DIF, que mostraba la señal de los compuestos muy ligeros de su aliento, y un cromatograma en EM, que mostraba la señal de los compuestos ligeros a pesados de su aliento. Figura 5.8.

Con estos cromatogramas se realizó una correlación visual, entre sujetos con distintas condiciones. Estas correlaciones se observan en las Figura 5.9 y Figura 5.10.

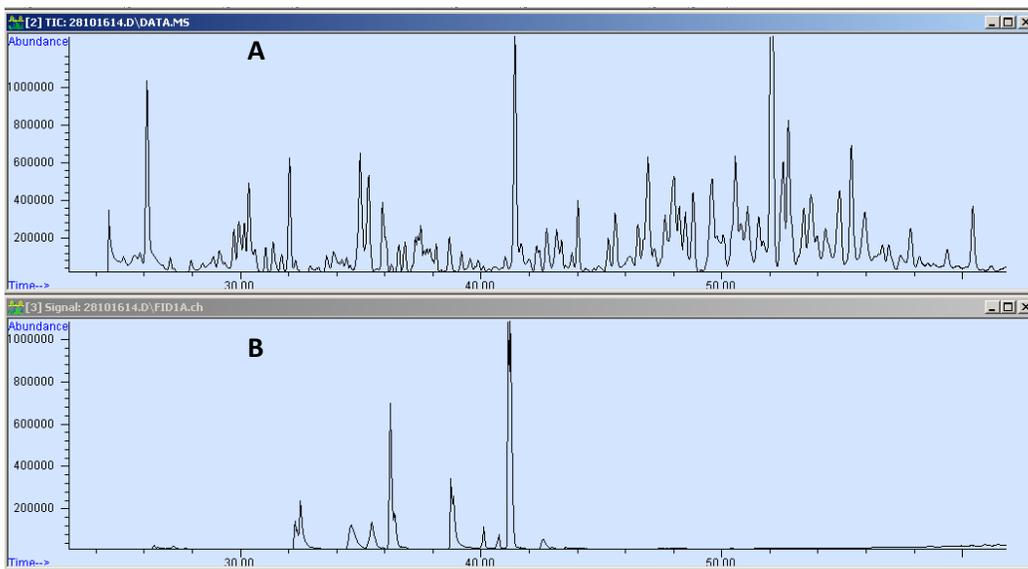


Figura 5.8 Cromatogramas obtenidos para las muestras de aliento A) en Espectrometría de Masas, B) con Detector de ionización de flama.

La Figura 5.9 muestra las diferencias entre un sujeto normoglicémico (negro) y dos sujetos prediabéticos (azul y rojo). Se puede observar como difieren en escala los picos de los pacientes prediabéticos de los normoglicémicos.

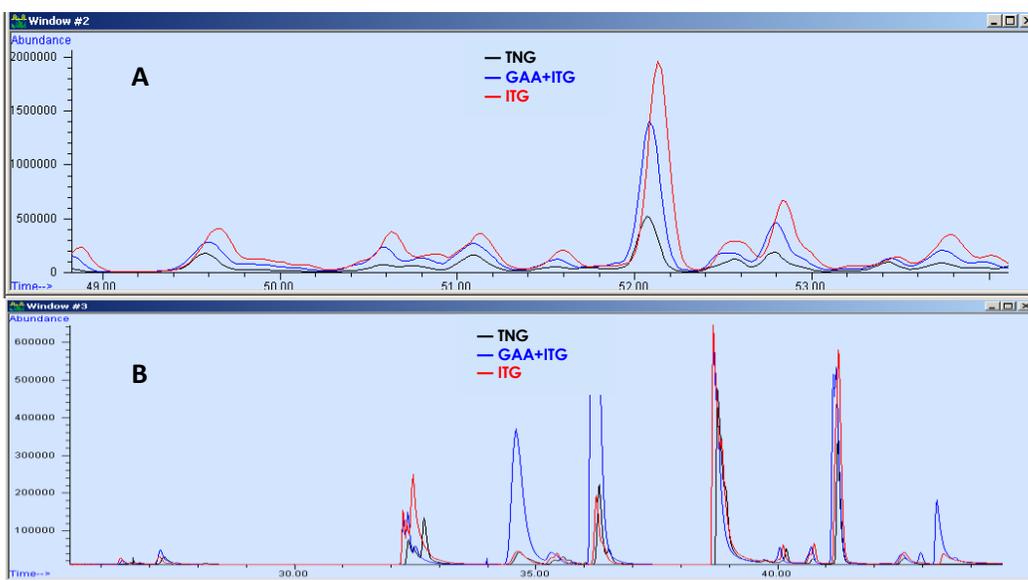


Figura 5.9 Correlación visual de cromatogramas de sujetos con TNG, ITG, GAA+ITG. A) señal del EM, B) señal del DIF.

La Figura 5.10 muestra las diferencias entre sujetos normoglicémicos y diabéticos. Se observaron mayores diferencias en abundancia comparadas a las abundancias de la Figura 5.9. Con esta visualización se apoya al marco teórico basado en los resultados de Gallego (2016), ya que al inspeccionar los picos con el Software ChemStation se

comprobó que los compuestos que presentan mayor diferencia corresponden a los de la Tabla 5.

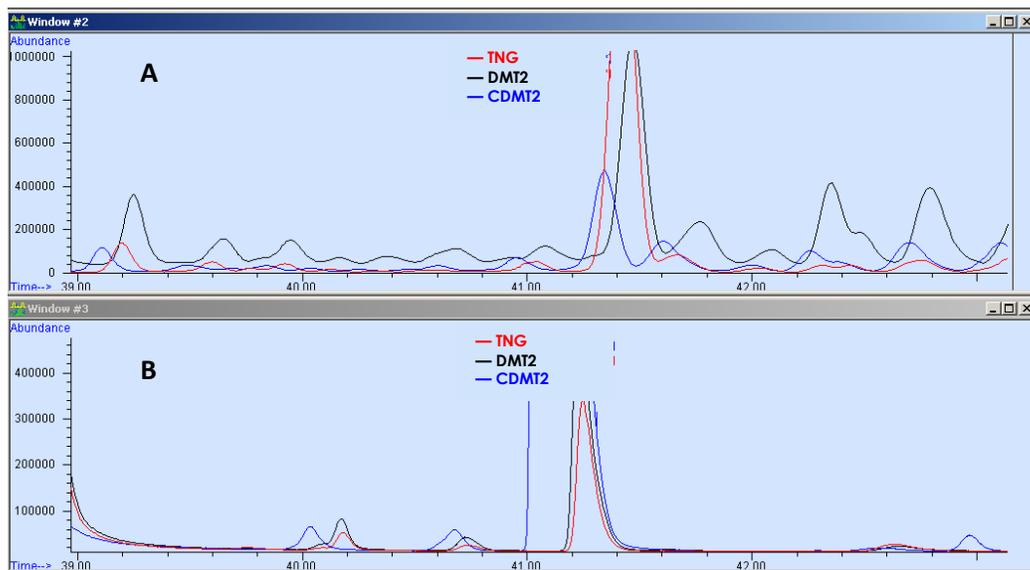


Figura 5.10 Correlación visual subjetiva de cromatogramas de sujetos con TNG, DMT2, CDMT2. A) señal del EM, B) señal del DIF.

#### 5.4 ANÁLISIS CUALITATIVO

Para realizar el análisis cualitativo, se consideró seguir los 25 compuestos (salvo la butenona) mostrados en la Tabla 5.

De la correlación visual de cromatogramas se pudo observar dos compuestos en la señal DIF, los cuales se presumió podrían ser indicadores de diabetes y prediabetes. A estos compuestos se les nombró "X" e "Y" debido a que no pueden ser identificados si no se cuenta con un estándar gaseoso en el DIF.

Los coeficientes de variación de presencia de metabolitos intraindividual e interindividual de los grupos muestreados se presentan en la Tabla 10. Este coeficiente nos permite observar la variación biológica de los compuestos de los grupos muestreados.

Tabla 10. COEFICIENTES DE VARIACION DE PRESENCIA DE METABOLITOS DE LOS GRUPOS MUESTREADOS		
Grupo	CV Intraindividual (%)	CV Interindividual (%)
TNG	58±9	64 ±23
ITG	48±9	74±31
GAA+ITG	45±3	71±29
RDMT2	41±5	51±16
DMT2	59±16	46±26
CDMT2	NA	68±36

El análisis diferencial de los compuestos respecto a la población normoglicémica y las poblaciones prediabéticas se muestra en la Figura 5.11 donde los compuestos se distribuyen ordenadamente de acuerdo al número de moléculas de carbono de muy ligeros (izquierda) a pesados (derecha). Se puede observar que existe una diferencia significativa para algunos compuestos en los diferentes grupos de estudio. Teniendo compuestos que se distinguen en la condición de ITG y/o GAA+ITG.

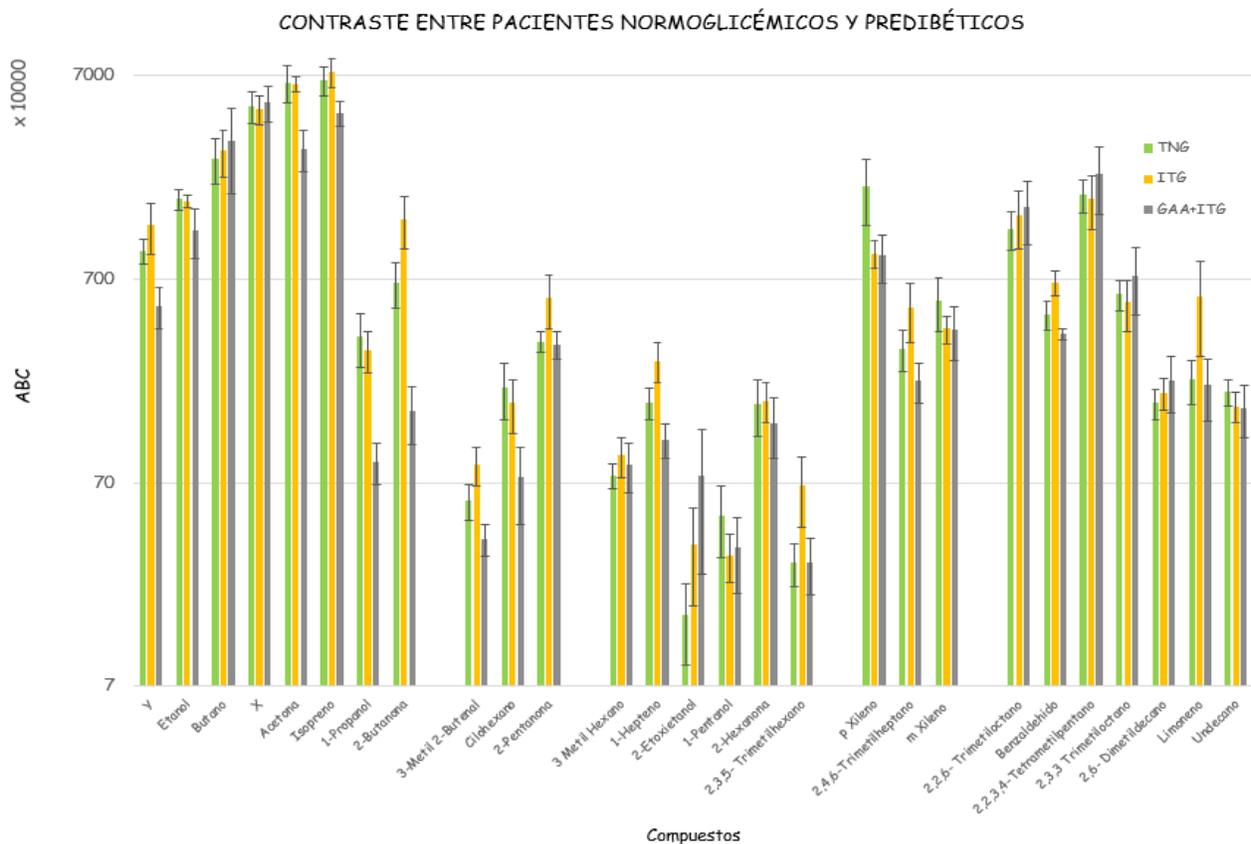


Figura 5.11 Contraste de compuestos entre pacientes con TNG y prediabéticos

En la Figura 5.12 se muestra el análisis diferencial de las poblaciones diabéticas, respecto a la población normoglicémica. Se observó que las poblaciones donde existen más compuestos con una diferencia significativa son los DMT2 y CDMT2.

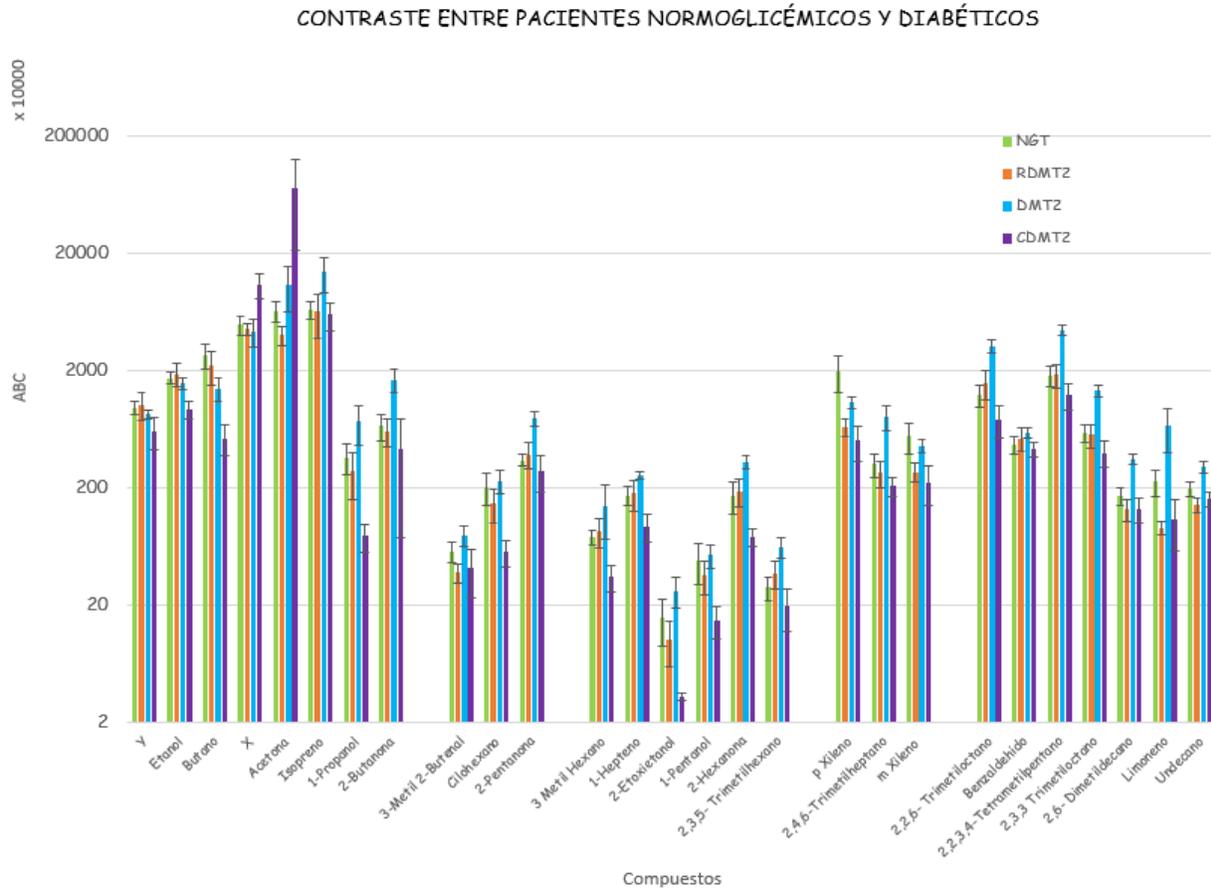


Figura 5.12 Contraste de compuestos entre pacientes con TNG y diabéticos.

A partir de este análisis diferencial mostrado en la Figura 5.12, se determinó que los compuestos con una diferencia significativa para el estudio de la prediabetes son los mostrados en la Tabla 11. De igual modo se muestran los compuestos contrastados entre la población normoglicémica y diabética.

Se encontraron 14 metabolitos significativos para la condición de prediabetes. De éstos, 7 metabolitos tienen potencial para describir la condición ITG, y 10 metabolitos tienen el potencial de describir la condición GAA+ITG. Los metabolitos que coinciden para las dos condiciones son: 1-Hepteno, 2-Butanona y p-Xileno.

**Tabla 11. Compuestos con una diferencia significativa por grupo estudiado.**

	COMPUESTO	ITG	GAA+ITG	RDMT2	DMT2	CDMT2
1	Y	x	✓	x	x	✓
2	Etanol	x	x	x	x	✓
3	Butano	x	x	x	✓	✓
4	X	x	x	x	x	✓
5	Acetona	x	✓	✓	x	✓
6	Isopreno	x	✓	x	✓	x
7	1-Propanol	x	✓	x	x	✓
8	2-Butanona	✓	✓	x	✓	x
9	3-Metil 2-Butenal	x	✓	✓	x	x
10	Ciclohexano	x	✓	x	x	✓
11	2-Pentanona	✓	x	x	✓	x
12	3 Metil Hexano	x	x	x	x	✓
13	1-Hepteno	✓	✓	x	✓	✓
14	2-Etoxietanol	x	✓	x	x	✓
15	1-Pentanol	x	x	x	x	✓
16	2-Hexanona	x	x	x	✓	✓
17	2,3,5- Trimetilhexano	✓	x	x	✓	x
18	p-Xileno	✓	✓	✓	✓	✓
19	2,4,6-Trimetilheptano	x	x	x	✓	x
20	m-Xileno	x	x	✓	x	✓
21	2,2,6- Trimetiloctano	x	x	x	✓	x
22	Benzaldehido	✓	x	x	x	x
23	2,2,3,4-Tetrametilpentano	x	x	x	✓	x
24	2,3,3 Trimetiloctano	x	x	x	✓	x
25	2,6- Dimetildecano	x	x	x	✓	x
26	Limoneno	✓	x	✓	✓	✓
27	Undecano	x	x	x	✓	x

La Tabla 11 además muestra que los 27 metabolitos estudiados como biomarcadores de diabetes mellitus tipo 2, están asociados al menos a uno de los tres grupos de sujetos diabéticos estudiados. Son 5 los metabolitos con una diferencia significativa que pueden describir potencialmente al grupo RDMT2, para el grupo de DMT2 son 15 metabolitos y para los CDMT2 son 15 metabolitos. Los metabolitos en común para los tres grupos estudiados son el p-Xileno y el Limoneno.

Tras este análisis cualitativo, se expone que el metabolito que está presente en todos los grupos de estudio y que presenta una diferencia significativa para ser un biomarcador potencial tanto para la prediabetes como la diabetes tipo 2 es el p-Xileno. Los siguientes metabolitos que presentaron mayor frecuencia en los grupos estudiados son el 1-Hepteno y el Limoneno.

Respecto a la acetona, la cual es un metabolito muy estudiado como potencial biomarcador para diagnosticar la DMT2, se observó un comportamiento no lineal, de tal forma que la concentración de este compuesto disminuye para la condición de prediabetes GAA+ITG, respecto al grupo de control. Sin embargo, para estados donde la enfermedad ya está presente se notó un incremento acelerado en que en etapas temprana de la enfermedad la acetona, en nuestro estudio, aparecía en rangos similares a los normales y un poco más elevados también. Lo cual nos permite determinar que este compuesto se comporta de una manera particular en las etapas tempranas de prediabetes y de una manera diferentes a principios de la enfermedad.

Sobre los biomarcadores potenciales descritos anteriormente, existe una serie de investigaciones que los vinculan con alteraciones metabólicas o enfermedades hepáticas.

Friedman (1994) y colaboradores compararon el aire alveolar de sujetos de control contra pacientes con enfermedades hepáticas. En este estudio se encontró al limoneno con concentraciones inusualmente altos, especialmente para personas con enfermedad hepática no colestática.

De igual manera Fernández del Rio (2015) y colaboradores estudiaron el aliento de personas con cirrosis hepática, y posterior a un trasplante de hígado. En este estudio se observó que los sujetos con la enfermedad tenían niveles elevados de Limoneno, y posterior al trasplante de hígado, estos niveles disminuyeron considerablemente, siendo el limoneno el metabolito con mejor capacidad diagnóstica.

Respecto al 1-hepteno, existen investigaciones donde se vincula con enfermedades metabólicas. (Günther1996)

Eng (2015) y colaboradores estudio el aliento de una población de niños con enfermedades hepáticas crónicas, respecto a un grupo de control. En este estudio se encontró que los niveles de 1-deceno, 1-hepteno, 1-octano y 3-metilhexano eran significativamente mayores a los niveles del grupo de control.

Existen compuestos, que, como fuente primaria, es la inhalación de estos mismos en el ambiente. Algunos de estos COVs, como los xilenos y toluenos, son absorbidos en el sistema circulatorio y han sido reportados en muestras sanguíneas de personas no ocupacionalmente expuestas. Al ser absorbidos dentro del cuerpo humano, un gran porcentaje de estos compuestos son metabolizados por enzimas. El p-Xileno, por ejemplo, es sintetizado por enzimas hepáticas. Los cambios metabólicos pueden modificar esta síntesis y elevar o disminuir las concentraciones de estos compuestos externos. (Chau 2012) (KEGG 2008) (Wishart 2013)

En el trabajo de Gallego (2016), quien tiene la investigación consultada más amplia en metabolitos encontrados en sujetos con DMT2, se encuentran todos los metabolitos descritos anteriormente. Esta investigación está fundamentada por investigaciones previas que se encontraron en la literatura, donde se analizan algunos metabolitos por separado para esta misma patología, sin embargo, en la investigación de Gallego(2016) y en esta investigación hemos detectado otros metabolitos no mencionados en la literatura que podrían ser potenciales biomarcadores de la prediabetes y diabetes.

## **5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **5.5.1 ANOVA**

Los análisis de varianza de los compuestos entre los 6 grupos estudiados más representativos se muestran en la Tabla 12.

En esta tabla se observan 10 compuestos con un valor significativo de F. Esto significa que, si existe alguna relación entre los grupos estudiados por cierto compuesto de interés, y este compuesto tiene un valor F significativo, es decir, mayor al valor crítico de F, esta relación tiene significancia.

En esta tabla se observa que tanto el 2-butanona y el 1-hepteno tienen un valor F significativo. Estos dos compuestos anteriormente en el 5.4 y en el 5.5.3 , mostraron tener una posible relación con los sujetos prediabéticos

De igual forma todos los compuestos presentados en la Tabla 12, han mostrado ser potentes biomarcadores principalmente para la DMT2.

Tabla 12. ANOVA		
Compuesto	F	Valor crítico para F
X	3.46	2.52
1-propanol	3.43	2.52
2-butanona	3.43	2.52
1-heptano	2.74	2.52
2-hexanona	2.87	2.52
2,4,6-trimetil heptano	2.80	2.52
2,2,6-trimetil octano	3.27	2.52
2,2,3,4-tetrametil pentano	3.73	2.52
2,3,3 trimetil octano	3.48	2.52
2,6- dimetil decano	3.19	2.52

### 5.5.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

En la Figura 5.13 se muestran gráficos de cajas y bigotes de algunos compuestos de especial interés descriptivo para la población prediabética.

Algunos valores atípicos fueron expresados para el p-xileno, el limoneno, el 2,4,6 trimetilheptano y la 2-hexanona. Se presentan traslapos en la mayoría de las gráficas entre los valores máximos y mínimos.

Se observa que para la 2 butanona, la mediana del grupo ITG y el promedio está por encima tanto de la mediana como del promedio del grupo TNG. La mediana y el promedio del grupo GAA+ITG se encuentra muy por debajo de la mediana del grupo TNG. Se infiere que la diferencia estadística es relevante.

Para el 1-hepteno se observa que para el grupo ITG, el promedio y la media son muy cercanos y son valores alejados del promedio y la media del grupo TNG. Para el grupo GAA+ITG la media y promedio coinciden y sus valores están por debajo del promedio y media del grupo TNG. Se infiere que la diferencia estadística es relevante.

Para el p-xileno, las medianas y promedios de los dos grupos prediabéticos se encuentran por debajo significativamente del promedio y media del grupo TNG.

Para el limoneno y la 2-hexanona se observa una mayor diferencia de los promedio y medianas para los grupos diabéticos contrastados con el grupo TNG. Marcando mayor relevancia para esta enfermedad que para la prediabetes.

El 2,4,6 trimetilheptano, muestra diferencia entre los promedios y medianas de los grupos prediabéticos respecto al grupo TNG y de igual forma para los grupos diabéticos.

Cabe destacar que este compuesto no muestra diferencias significativas en el análisis cualitativo del capítulo 5.4 .

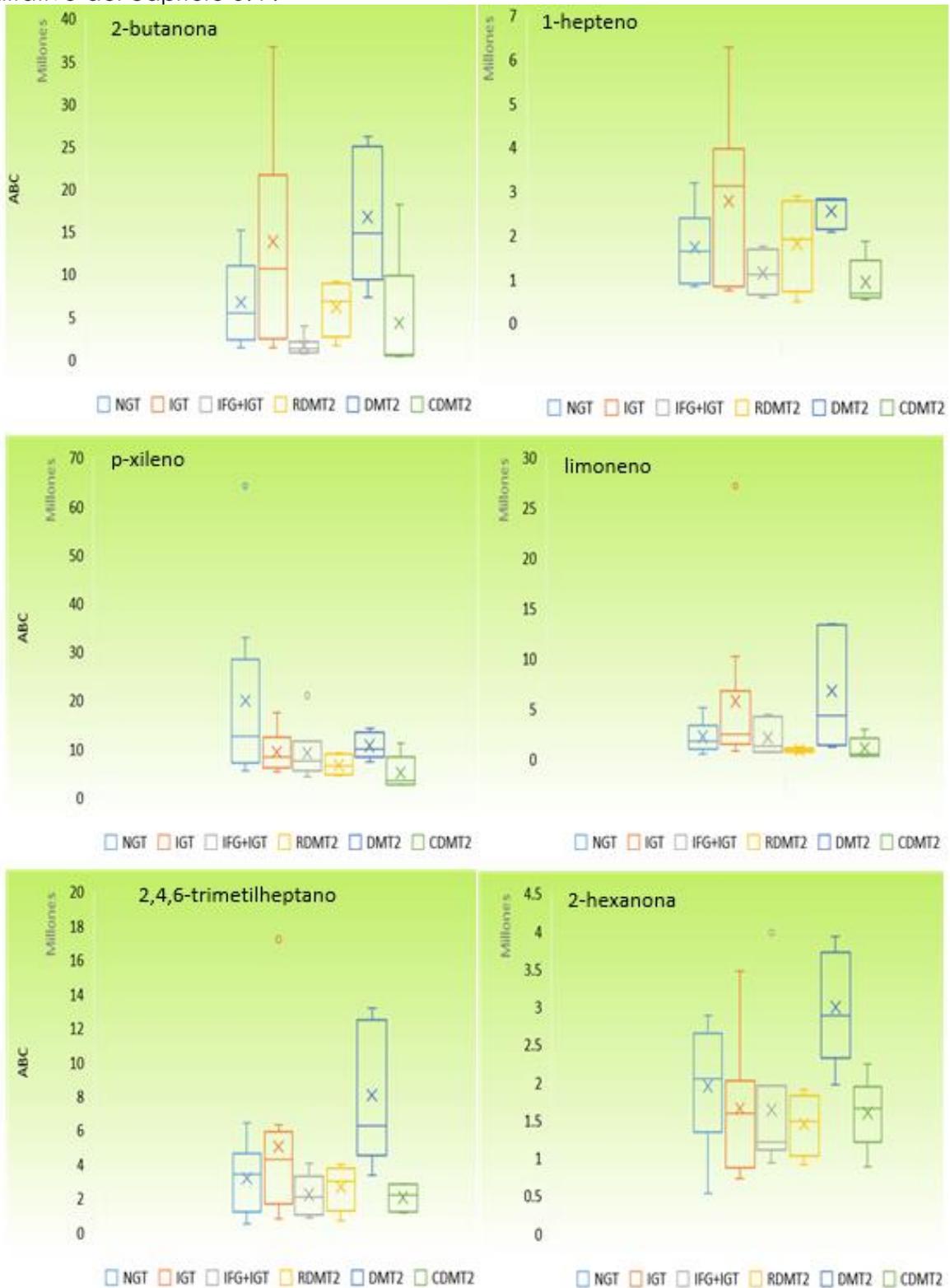


Figura 5.13 Gráficos de cajas y bigotes de algunos compuestos de interés

### 5.5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se aplicó el análisis de componentes principales a los siguientes datos:

- A) Sujetos TNG, GAA+ITG e ITG
- B) Sujetos TNG, DMT2 y CDMT2
- C) Los 6 grupos de estudio

En la Tabla 13 se muestran los componentes principales para cada ACP, así como la fracción descrita y contribuciones de varianza. Es posible observar que las primeras dos componentes, CP1 y CP2, describen en A) el 50%, en B) el 55% y en C) el 50% de la varianza.

<b>Tabla 13. Componentes Principales</b>									
<b>DATOS</b>	<b>A</b>			<b>B</b>			<b>C</b>		
	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>
<b>Compuesto</b>	Undecano	2,4,6 trimetil heptano	Limoneno	2-Hexanona	1 hepteno	2,6 dimetil decano	Undecano	2,2,3,4 tetrametil pentano	2,3,3 trimetil octano
<b>Varianza</b>	8.889	4.580	2.558	11.546	3.315	2.494	9.734	3.681	2.265
<b>Fracción de varianza (%)</b>	32.921	16.961	9.476	42.762	12.280	9.238	36.054	13.633	8.390
<b>Varianza acumulada (%)</b>	32.921	49.883	59.358	42.762	55.042	64.280	36.054	49.685	58.075

En las Figura 5.14, Figura 5.15, Figura 5.16, se muestran los planos de las correlaciones de los casos A, B y C analizados.



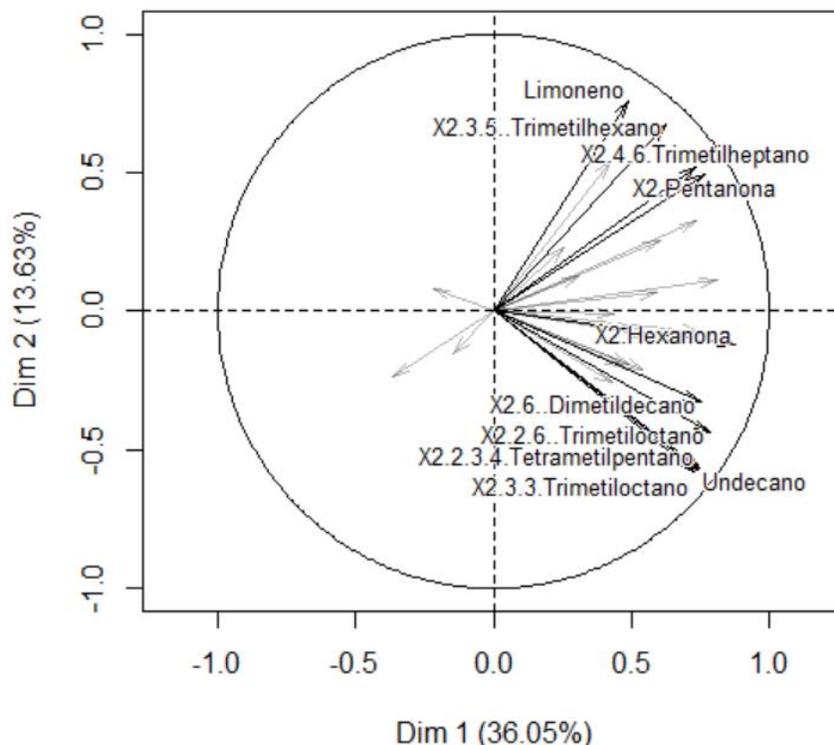


Figura 5.16 Plano de factor variable, Caso C: TNG, GAA+ITG, ITG, RDMT2, DMT2, CDMT2. Con nombre los 10 componentes principales con mayor peso.

Los vectores de las Figura 5.14, Figura 5.15 y Figura 5.16 representan la dirección de mejor ajuste para cada uno de los compuestos.

La correlación del vector se mide aproximadamente con el coseno del ángulo formado por el vector de interés y el eje. Existirá una gran correlación con ángulos agudos, una correlación inversa con ángulos colineales y no se presentará correlación con ángulos rectos.

Los compuestos que simplifican el espacio muestral definidos como componentes principales entre sujetos sanos y prediabéticos son el undecano y el 2,4,6 trimetilheptano. Ambos compuestos muestran no ser significativos como potenciales biomarcadores en la prediabetes en la Tabla 11.

El undecano ha sido anteriormente estudiado como potencial biomarcador para la diabetes mellitus. (Pereira 2014) El 2,4,6 trimetilheptano es parte de la línea basal de personas diabéticas definida en el trabajo de Gallego (2016)

Los compuestos que simplifican el espacio muestral definidos como componentes principales entre sujetos sanos y diabéticos son la 2-hexanona y el 1-hepeno.

La 2-hexanona es parte de la línea basal de personas diabéticas definida en el trabajo de Gallego (2016). El 1-hepteno, como se menciona en el capítulo 5.4 ha sido

estudiado como biomarcador potencial de enfermedades metabólicas, hepáticas y en la diabetes. (Eng 2015)

Los compuestos que simplifican el espacio muestral definidos como componentes principales entre los 6 grupos de estudio son el undecano y el 2,2,3,4 tetrametil pentano. Ambos compuestos muestran no tener diferencias significativas en la Tabla 11, para ser considerados como potenciales biomarcadores de todo el espectro entre sujetos normoglicémicos hasta llegar a un estado crítico de diabetes.

En las Figura 5.17 Figura 5.18, y Figura 5.19 se muestran los planos de factores de individuos.

En la Figura 5.17 se observa que los sujetos con ITG son colocados en el cuadrante superior derecho en su mayoría. Los sujetos con GAA+ITG se localizan en el cuadrante inferior izquierdo, al igual que los sujetos con TNG. Se puede observar como este último grupo se encuentra muy cercano al eje  $x = 0$ , colocándolo en su mayoría muy cercano al origen. En este plano es posible observar el espectro que crea el estudio de pacientes normoglicémicos y prediabéticos y que en general separa a estos 3 grupos de estudio. Además, que con este análisis se demuestra fácilmente que las dos condiciones de prediabetes están vinculadas a diferentes metabolitos encontrados en el aliento por su localización en diferentes cuadrantes.

En la Figura 5.18 se observa al 100% de los sujetos con CDMT2 en el cuadrante inferior izquierdo. El 80% de los sujetos con DMT2 se localizan en el cuadrante inferior derecho. Los sujetos con TNG en su mayoría los localiza en el cuadrante superior izquierdo. En este plano se observa claramente la diferenciación por grupos de pacientes normoglicémicos y diabéticos.

En la Figura 5.19 se observa el espectro creado por los 6 grupos de estudio. Se observa a los sujetos con CDMT2 en su mayoría en el cuadrante inferior izquierdo, los sujetos con DMT2 en el cuadrante inferior derecho, los sujetos con RDMT2 sobre el eje  $x = 0$ , los sujetos con ITG en el eje superior derecho, los pacientes con GAA+ITG en el cuadrante inferior izquierdo y los sujetos con TNG prácticamente en el origen del plano, como era de esperarse.

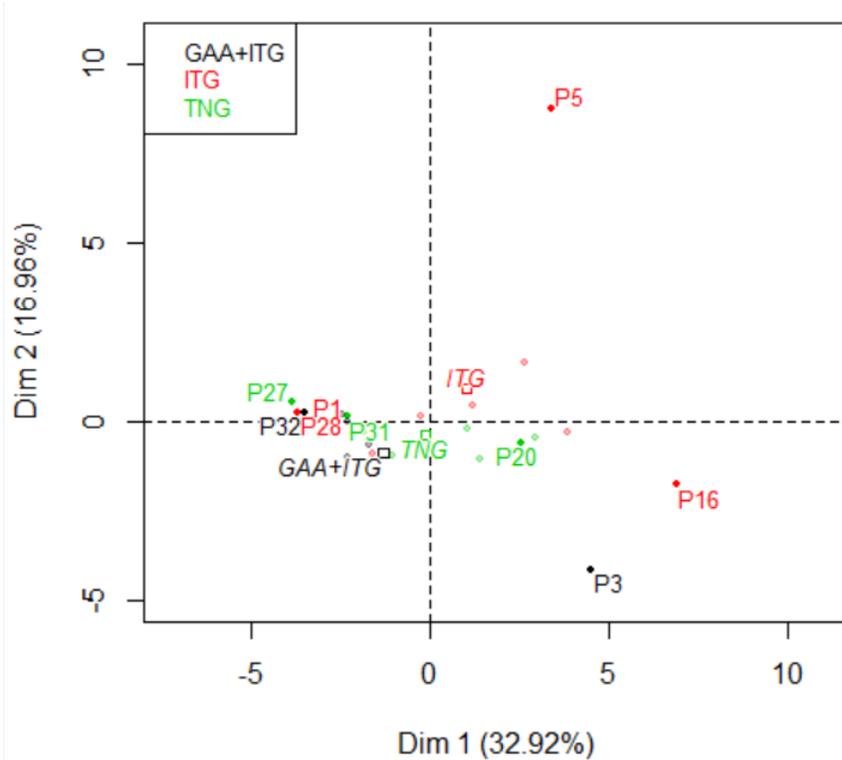


Figura 5.17 Plano de factores de individuos, Caso A: TNG, GAA+ITG, ITG.

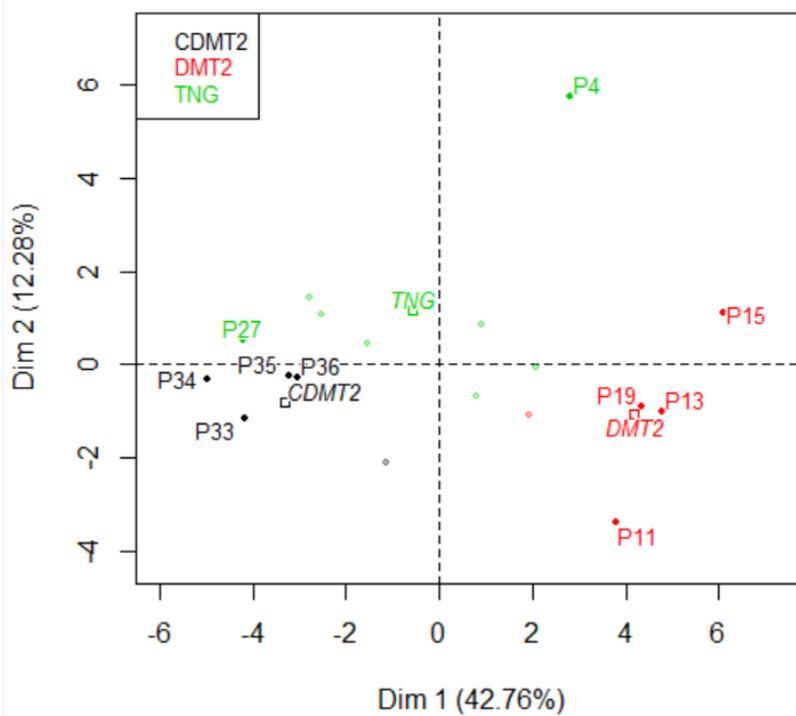


Figura 5.18 Plano de factores de individuos, Caso B: TNG, DMT2, CDMT2.

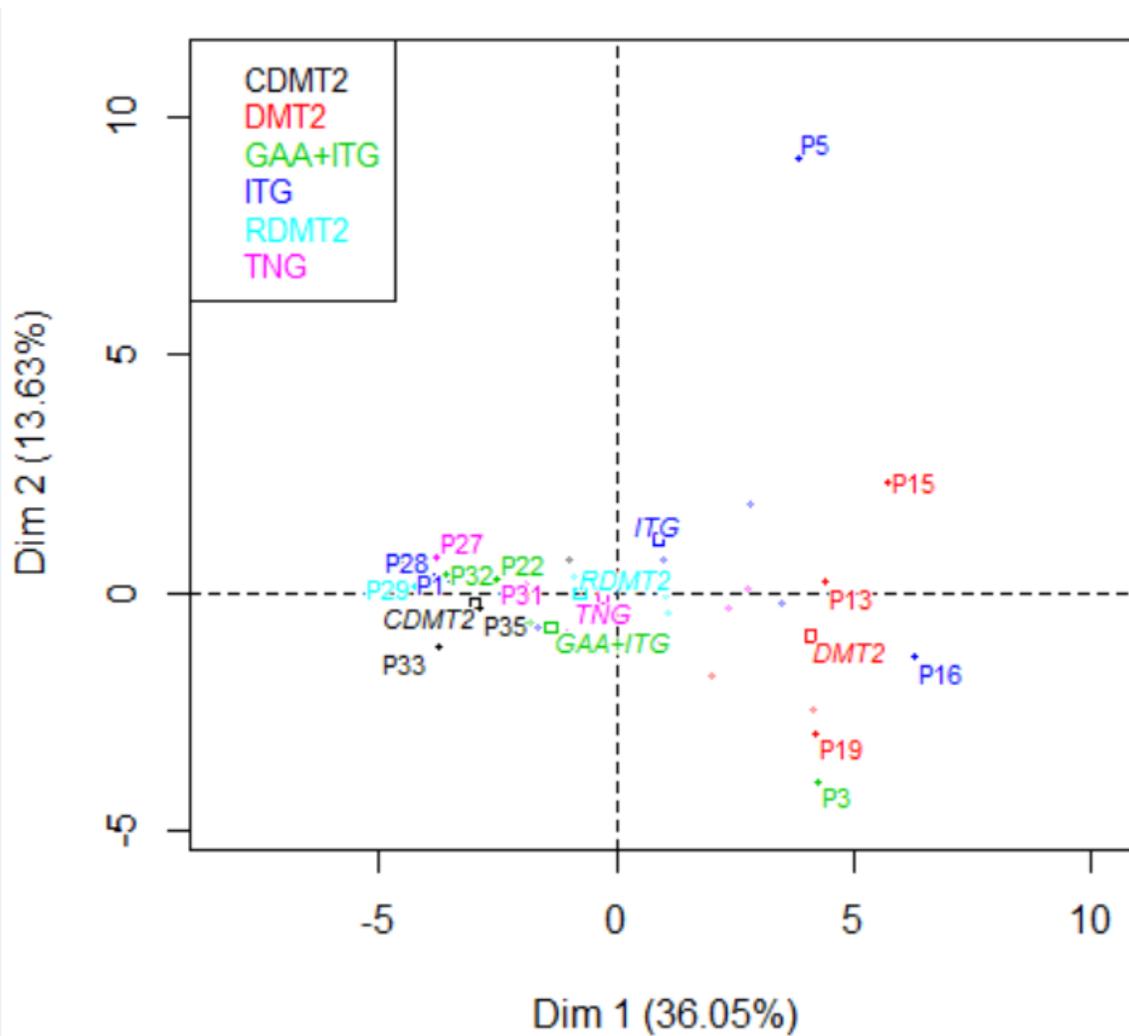


Figura 5.19 Plano de factores de individuos, Caso C: TNG, GAA+ITG, ITG, RDMT2, DMT2, CDMT2.

## 5.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO

### 5.6.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Como resultado de realizar la dilución estática descrita en los métodos TO-01 y TO-17 de la EPA se obtuvo un bulbo gaseoso.

Las concentraciones en el bulbo de dilución estática y en la bala gaseosa de los compuestos en estándares gravimétricos gaseosos se presentan en la Tabla 14. Estas concentraciones se ocuparon para hacer las curvas de calibración, al inyectar ciertos volúmenes del compuesto, en forma gaseosa, en el CG-EM-DIF del CCA, UNAM.

En la Figura 5.20 se muestra una de las curvas de calibración obtenidas.

Tabla 14. Concentraciones de los compuestos	
Compuesto	Concentración gaseosa (ug/ml)
Etanol	3.7 ± 0.2
Butano	0.00203±0.00001
Acetona	7.4 ± 0.2
Isopreno	6.3 ± 0.2
2-butanona	7.5 ± 0.2
2-pentanona	7.5 ± 0.2
2-etoxietanol	38.9 ± 0.2
1-pentanol	7.6 ± 0.2
2-hexanona	7.5 ± 0.2
Benzaldehido	9.7 ± 0.2
Limoneno	11.7 ± 0.2
Ciclohexano	0.00289 ± 0.00001
m/p-xileno	0.001769 ± 0.000009
m-xileno	0.00347 ± 0.00002
Undecano	0.00480 ± 0.00002

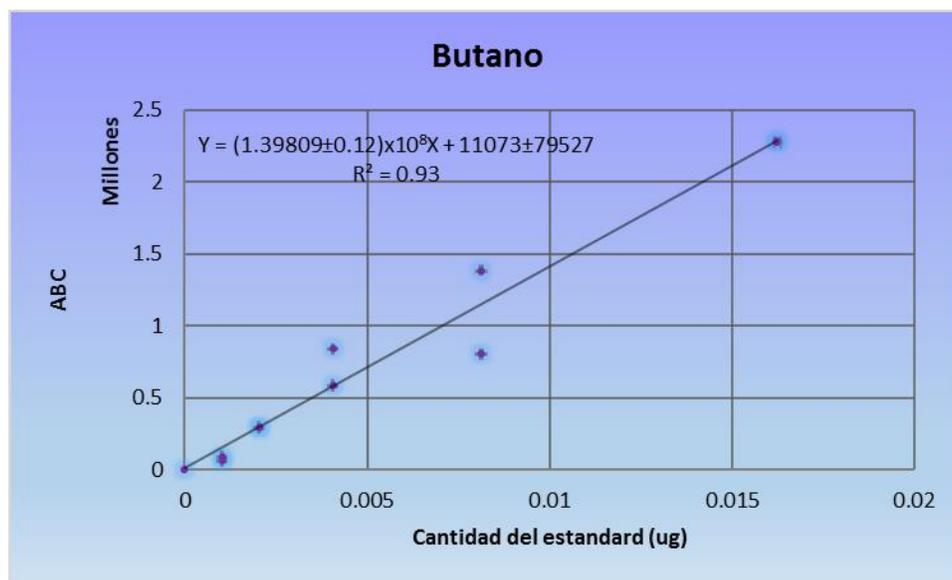


Figura 5.20. Curva de calibración del butano.

## 5.6.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LAS MUESTRAS DE ALIENTO

Con el ajuste de las curvas de calibración, se pudieron obtener las concentraciones de los compuestos en el aliento en los diferentes grupos de estudio.

La Tabla 15 muestra el promedio de la concentración en partes por billón volumétricas (PPBv) de estos compuestos en los diferentes grupos estudiados en este trabajo.

<b>Tabla 15. Concentración de metabolitos en el aliento (PPBv)</b>						
<b>Metabolito/Grupo</b>	<b>NGT</b>	<b>ITG</b>	<b>GAA+ITG</b>	<b>RDMT2</b>	<b>DMT2</b>	<b>CDMT2</b>
<b>Etanol</b>	54.2 ± 0.5	54.0 ± 0.3	53.0 ± 0.8	55 ± 1	53.9 ± 0.4	52.0 ± 0.4
<b>Butano</b>	90 ± 19	114 ± 30	128 ± 52	85 ± 27	54 ± 12	20 ± 6
<b>Acetona</b>	265 ± 41	256 ± 16	158 ± 19	188 ± 23	391 ± 136	2215 ± 1523
<b>Isopreno</b>	122 ± 17	139 ± 19	95 ± 9	125 ± 41	243 ± 72	118 ± 25
<b>2-Butanona</b>	71 ± 2	78 ± 4	65.8 ± 0.5	71 ± 2	81 ± 4	68 ± 3
<b>Ciclohexano</b>	20 ± 7	16 ± 5	6 ± 3	14 ± 5	22 ± 5	5 ± 1
<b>2-Pentanona</b>	27.8 ± 0.4	30 ± 1	27.7 ± 0.4	28.2 ± 0.8	32 ± 1	27.1 ± 0.8
<b>2-Etoxi Etanol</b>	183 ± 2	188 ± 4	189 ± 8	184 ± 1	184 ± 2	179 ± 0.2
<b>1-Pentanol</b>	39 ± 1	38.2 ± 0.5	38.6 ± 0.9	38.9 ± 0.8	40.0 ± 0.8	37.1 ± 0.3
<b>2-Hexanona</b>	27.4 ± 0.5	27.9 ± 0.7	27.2 ± 0.7	28.1 ± 0.8	30.4 ± 0.7	26.1 ± 0.2
<b>p Xileno</b>	9 ± 3	4.0 ± 0.6	3.9 ± 0.9	2.8 ± 0.5	4.6 ± 0.5	2.2 ± 0.7
<b>m Xileno</b>	11 ± 4	4.0 ± 0.6	4 ± 1	2.8 ± 0.5	4.6 ± 0.6	2.3 ± 0.8
<b>Benzaldehido</b>	76 ± 4	87 ± 4	72 ± 1	80 ± 6	83 ± 3	74 ± 3
<b>Limoneno</b>	31 ± 3	48 ± 14	30 ± 3	24.6 ± 0.5	53 ± 13	25 ± 2
<b>Undecano</b>	4.1 ± 0.6	3.5 ± 0.6	3.4 ± 0.9	3.1 ± 0.4	6.4 ± 0.7	3.3 ± 0.5

En la Tabla 15 se muestran las concentraciones de 15 compuestos que se presentan en el aliento.

Esencialmente todos son biomarcadores potenciales de la DMT2. Aunque también se observan las concentraciones de los compuestos de los pacientes con prediabetes, siendo algunos los que cuentan con alguna diferencia significativa para apuntar a esta condición metabólica. También se observan las concentraciones para el grupo con tolerancia normal a la glucosa (NGT), los cuales han sido estudiados como línea basal entre sujetos sanos y diabéticos por Gallego (2016).

Con la identificación y cuantificación de los compuestos orgánicos volátiles en el aliento, es posible acercarnos a la investigación de métodos más prácticos, para el diagnóstico de la enfermedad, como la utilización de sensores de detección específica de estado sólido, narices electrónicas y dispositivos POC.

Actualmente existen diversas investigaciones en las cuales se han creado sensores de alta sensibilidad de compuestos.

Li (2016) y colaboradores han desarrollado un sensor de gran sensibilidad (11.06 ug/ml) de 2-butano gaseoso, elaborado con hojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y nanopartículas de óxido de cobre añadidas.

Wei (2012) y colaboradores han desarrollado un sensor a base de nitruro de indio con resolución por debajo de partes por billón (ppm) para la detección de acetona en el aliento en sujetos diabéticos.

Lee (2015) desarrolló un sensor sensible a terpenos como el limoneno con resistencias tipo puente y tecnología CMOS. Este sensor es capaz de detectar concentraciones de pocas ppbv de limoneno.

Chatterjee (2013) y colaboradores desarrollaron una nariz electrónica (e-nose) a partir de sensores de resistencia cuántica y nanocompuestos de polímeros conductores. Ellos se basaron en un conjunto de metabolitos identificados como biomarcadores del cáncer de pulmón. Este dispositivo es capaz de detectar una serie de compuestos, entre ellos etanol, acetona, propanol, 2-butanona, ciclohexano, isopreno y xileno en concentraciones hasta por debajo de concentraciones del orden de ppm.

## CAPITULO 6: CONCLUSIONES

---

Respecto a la caracterización y clasificación de pacientes, se concluye que toda investigación clínica, que involucra a seres humanos, conlleva una gran complejidad. Un ejemplo que se observó claramente en este trabajo, fue que, dado que se investigó a fondo la condición médica de los pacientes; no todos los pacientes clasificados en el grupo de control podrían definirse con un cuadro sano, se clasificaron como normoglicémicos dado que sus condiciones diagnosticadas fueron consideradas irrelevantes para nuestro estudio. De igual manera los sujetos que presentaban cuadros de prediabetes y diabetes también presentaban condiciones diversas no asociadas con la diabetes directamente, pero si asociadas a factores genéticos, ambientales, socioculturales, nutricionales, geográficos, entre otros, que originan ambas condiciones de manera independiente.

Respecto al análisis de correlación visual de los cromatogramas se concluye que fue posible observar diferencias significativas, tanto en cromatogramas con señal DIF y con señal EM entre los 6 grupos de estudio. Además, que es posible el análisis cualitativo por forma de pico de los compuestos de interés en el equipo de CG-EM-DIF empleado. Esto es que, para un cierto compuesto su pico, en los diferentes grupos de estudio con una condición prediabética o diabética, se puede apreciar como un pico con curvas suaves y amplias si tiene niveles bajos de abundancia y picos en forma de impulso para niveles altos de abundancia del compuesto en el aliento comparados con el pico del compuesto para sujetos del grupo TNG.

Referente al análisis cualitativo de las muestras de aliento, se observó que al hacer el contraste entre el grupo TNG y los grupos prediabéticos, algunos de los metabolitos estudiados en este trabajo representan potenciales biomarcadores para la prediabetes.

Estos potenciales biomarcadores se puede clasificar en tres casos. El primer caso es que el metabolito estudiado en ambos grupos de prediabetes contrastado con el grupo TNG cuente con una diferencia significativa y que el error estándar no se traslape entre los tres grupos. Este caso se consideraría un biomarcador potencial primario, ya que para los dos tipos de prediabetes se estaría detectando la condición metabólica de prediabetes. Los potenciales biomarcadores primarios encontrados en este trabajo son la 2-butanona, el 1-hepteno y el p-xileno.

El segundo caso es que el metabolito estudiado solo tenga una diferencia significativa para uno solo de los grupos prediabéticos respecto al contraste con el grupo TNG y que el error estándar de este grupo prediabético no se traslape con el del grupo TNG. Y más importante, que tenga una diferencia apreciable entre medias y error estándar del otro grupo prediabético. En este caso el metabolito se consideraría como biomarcador secundario, con el cual se podría diferenciar entre nuestros dos grupos que caracterizan a la condición prediabética. Algunos compuestos encontrados como potenciales biomarcadores secundarios son la acetona, el 1-propanol, el benzaldehído

y el compuesto Y. El limoneno, a pesar de cubrir con los requisitos de este caso, tiene un historial extenso en la literatura de ser correlacionado con enfermedades hepáticas, lo cual, de ser considerado como único biomarcador, dificultaría un diagnóstico acertado de ambas enfermedades. Esto expone que un biomarcador puede tener un amplio espectro para detectar enfermedades, por lo que sería conveniente considerar para un diagnóstico de enfermedad un conjunto de metabolitos alterados.

El tercer caso se define por dos condiciones, una es que las medias entre los tres grupos tengan valores muy similares sin importar el error estándar, la segunda condición es que el error estándar de alguno de los 3 grupos sea tan grande que englobe la media y el error estándar de los otros dos grupos. Ninguno de los compuestos que caen bajo estas condiciones serán considerados como potenciales biomarcadores de diagnóstico para la prediabetes.

Una vez ya analizados los compuestos, para clasificarlos en alguno de los casos anteriormente mencionados, si se ordenan los compuestos en base al número de moléculas de carbono, de menor a mayor, se observa que los compuestos muy ligeros y ligeros se asocian mayormente a una diferencia entre el grupo TNG y el grupo prediabético GAA+ ITG, y los compuestos pesados se asocian mayormente a una diferencia entre el grupo TNG y el grupo ITG.

Se concluye que algunos biomarcadores tienen comportamiento lineal, fácil de analizar con diferencias apreciables entre cada etapa entre un paciente sano y un paciente con diabetes diagnosticada, sin embargo, otros compuestos parecen no tener este comportamiento lineal, lo cual hace que su uso como un biomarcador primario sea difícil, ya que, al no seguir una tendencia lineal de crecimiento o decrecimiento, dos estados diferentes de salud pueden darnos una misma medida en este biomarcador.

Como ejemplo de esto, en caso de elegir a la acetona como un biomarcador de seguimiento desde etapas sanas, hasta la etapa crítica de la enfermedad, se observaría al principio una caída en los valores de concentración, y de aquí al presentarse la enfermedad, los niveles empezarán a aumentar. Sería necesario considerar otros biomarcadores potenciales, para determinar el estado del paciente, si no hay un registro completo de su evolución.

El análisis de los resultados de Figura 5.12 y Tabla 11, concernientes al análisis de pacientes en diferentes estadios de DMT2 comprueban y respaldan los resultados obtenidos en el trabajo previo de Gallego (2016).

Los componentes principales, del análisis de componente principales, de los tres grupos estudiados en el 5.5.3 mostraron una buena descripción de la varianza.

Aunque todos los compuestos han presentado ser potenciales biomarcadores para la diabetes, los componentes principales, para los grupos TNG y prediabéticos, coincidieron con compuestos poco significativos en el estudio cualitativo de los compuestos. Este mismo resultado se repitió para el ACP de los 6 grupos estudiados. Se concluye que para estos dos casos estos componentes mostraron la mayor estabilidad

y similitud en el ACP, a diferencia del ACP para los grupos TNG y diabéticos, donde los componentes principales coinciden con compuestos con variaciones significativas del grupo TNG. Por tanto, los componentes principales de mayor relevancia para sujetos prediabéticos resultan no ser una gran opción como potenciales biomarcadores de la prediabetes.

Además, el ACP nos presentó una buena diferenciación entre grupos con el análisis visual de los mapas de factores individuales de los grupos estudiados, especialmente para sujetos con CDMT2 y DMT2.

El análisis estadístico descriptivo respalda la postulación de los biomarcadores primarios para la prediabetes. En este análisis se observó que tentativamente el 2,4,6 trimetilheptano puede ser considerado como un compuesto de interés para la prediabetes, pero el análisis cualitativo y el error estándar considerado en la medición no lo respaldan.

Con el análisis de varianza del 1-heptano y la 2-butanona se respalda la propuesta de que estos compuestos sean considerados como potenciales biomarcadores primarios y el 1-propanol como potencial biomarcador secundario.

Con el análisis cuantitativo de algunos de los potenciales biomarcadores para la diabetes encontrados por Gallego (2016), se obtuvo la concentración de 2 de los potenciales biomarcadores primarios para la prediabetes, la 2-butanona y p-xileno. Las concentraciones que fueron calculadas para potenciales biomarcadores secundario de la prediabetes fueron para la acetona, el isopreno, el Ciclohexano, el benzaldehído y el limoneno.

Se recomienda como método más confiable de diagnóstico de la prediabetes por medio del aliento exhalado, la utilización de grupos de compuestos, como una combinación de los potenciales biomarcadores en este trabajo definidos como primarios y secundarios. Con la finalidad de asegurar la identificación de la condición de salud específica en la que se encuentra el paciente.

Al concluir esta fase de la investigación, la cual abordó la problemática del diagnóstico temprano de la diabetes en la población mexicana de una manera no invasiva, al enfocarnos en identificar potenciales biomarcadores para la prediabetes y diabetes en el aliento humano, el siguiente paso natural de este proyecto es la investigación de detectores o sensores que puedan identificar los compuestos gaseosos de hasta algunas centenas de ppbv, y posteriormente la construcción de dispositivos más eficientes y asequibles que puedan incluir los detectores del grupo de compuestos elegidos para el diagnóstico de la enfermedad.

# REFERENCIAS

---

Amman A., Smith D., *Volatile Biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*, Elsevier, Oxford, The Netherlands, San Diego 2013.

Amann A., The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva, *J. Breath Res.* 8 (2014) 034001 (17pp) doi:10.1088/1752-7155/8/3/034001.

ADA, Standards of medical care in diabetes-2016, *Diabetes care*, vol 39, sup 1, ISSN 1935-5548.

ALAD, Consenso de Prediabetes Documento de Posición de la Asociación Latinoamericana de Diabetes.

Barquera S., Campos I., Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy, *Globalization and Health*20139:3,DOI: 10.1186/1744-8603-9-3.

Cao W, Duan Y. Breath Analysis: Potential for Clinical Diagnosis and Exposure Assessment, *Clinical Chemistry* 52:5 800-811 (2006).

Chatterjee, S. Castro, M. Feller, J. F., An e-nose made of carbon nanotube based quantum resistive sensors for the detection of eighteen polar/nonpolar VOC biomarkers of lung cancer, *Journal of Materials Chemistry B*; 2013, Vol. 1 Issue 36, p4563-4575, 13p.

Chau Minh T. Blake D. Galassetti P. The Clinical Potential of Exhaled Breath Analysis For Diabetes Mellitus, *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 August; 97(2): 195–205. doi:10.1016/j.diabres.2012.02.006.

Chiang D., Chien-Chih L., Employing box-and-whisker plots for learning more knowledge in TFT-LCD pilot runs *International Journal of Production Research* Vol. 50, No. 6, 15 March 2012, 1539–1553.

College of Saint Benedict and Saint John's University, Box Plot: Display of Distribution, <http://www.physics.csbsju.edu/stats/box2.html>, 02/04/2017.

Cotes J. E., *Lung Function: Physiology, Measurement and Application in Medicine*, Sexta Edición, Blackwell, 2006.

Eng K., Alkhouri N., Cikach F., Analysis of breath volatile organic compounds in children with chronic liver disease compared to healthy controls. *J Breath Res.* 2015 Apr 20;9(2):026002. doi: 10.1088/1752-7155/9/2/026002.

Fenske J. D., Paulson S. E. (1999) Human Breath Emissions of VOCs, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 49:5, 594-598, DOI:10.1080/10473289.1999.10463831.

Fernández del Río R., O'Hara M.E., Holt A., Volatile Biomarkers in Breath Associated With Liver Cirrhosis — Comparisons of Pre- and Post-liver Transplant Breath Samples, *EBioMedicine*. 2015 Sep; 2(9): 1243–1250, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.027.

FIDFID, Atlas de la DIABETES de la Federación Internacional de Diabetes, Séptima Edición 2015.

Frenk J., Ruelas E., Programa de acción: Diabetes Mellitus, Secretaria de Salud, México, 2011.

Friedman M. I., Preti G., Deems R. O., Limonene in expired lung air of patients with liver disease, *Dig Dis Sci*. 1994 Aug;39(8):1672-6.

Gallego A., Análisis de metabolitos presentes en el aliento Exhalado: Determinación de la línea basal Tesis Maestría, UNAM, Ciudad de México, México 2015.

Guiochon G., Guillemin C., *Quantitative gas chromatography for laboratory analyses and on-line process control*, *J. Chromatography Library V.42* (Elsevier, The Netherlands, 1988.)

Günther H., Chrzanowski A., Ottawa N., Breath Analysis from Patients with Metabolic Disorders: GC-MS Analysis with a Combined Thermodesorption - Cooled Injection System, Global Analytical Solutions, GERSTEL GmbH & Co. KG, Germany, 1996.

Guyton A., Hall J., Tratado de fisiología médica, 12 edición, Elsevier España, 2011

Hernández M., Gutiérrez J. P., Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia, *Salud Pública Mex*. 2013; 55 supl. 2: S129-S136.

Hernández M., Gutiérrez J. P., Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia, *Salud Pública Mex*. 2013; 55 supl. 2: S129-S136.

Inzucchi S. E., CLINICAL PRACTICE, Diagnosis of Diabetes, *N Engl J Med* 2012; 367:542-550, DOI: 10.1056/NEJMcp1103643.

Jolliffe T., Cadima J., Principal component analysis: a review and recent developments, Springer, USA, 2002.

KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>

Le S., FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis, *Journal of Statistical Software*, March 2008, Volume 25, Issue 1.

Lee S. P. Terpene sensor array with bridge-type resistors by CMOS technology, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 87 (2015) 012065 doi:10.1088/1757-899X/87/1/012065.

Li L., Hu Y., Deng D., Highly sensitive cataluminescence gas sensors for 2-butanone based on g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> sheets decorated with CuO nanoparticles, *Anal Bioanal Chem.* 2016 Dec;408(30):8831-8841.

Lourenço C., Turner C. *Review Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Consideration and Application, Metabolites* 2014, 4, 465-498; doi:10.3390/metabo4020465.

Monroy A. Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa. Datos sin Publicar. Ciudad de México, México. 2/05/2017.

Munguía-Miranda C., Prevalencia de dislipidemias en una población de sujetos en apariencia sanos y su relación con la resistencia a la insulina, *Salud pública Méx* vol.50 no.5 Cuernavaca sep./oct. 2008.

NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, consultado el 17/11/2016.

NOM-015-SSA2-2010, NORMA Oficial Mexicana, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

NOM-037-SSA2-2002, NORMA Oficial Mexicana, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.

NSW, Australia Diabetes Council, Talking diabetes no 29. Pre-diabetes (IFG and IGT), 2012.

Pereira J., Porto-Figueira P. *Review Breath Analysis as a Potential and Non-Invasive Frontier in Disease Diagnosis: An Overview, Metabolites* 2014, 5, 3-55; doi:10.3390/metabo5010003.

Perma Pure, All About Nafion, consultado el 19/05/2017 <http://www.permapure.com/resources/all-about-nafion-and-faq/>.

Phillips M., Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans, *Journal of Chromatography B*, 729 (1999) 75-88.

Ramírez C., DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE TRAZAS MOLECULARES PRESENTES EN EL ALIENTO HUMANO EXHALADO POR CROMATOGRFÍA DE GASES, Tesis de Licenciatura, formato digital, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE MORELOS, Morelos, México.

Raña A. Unidades de medición empleadas en Calidad del Aire, tropósfera, portal temático de contaminación del aire. <http://www.troposfera.org/conceptos/unidades-de-medicion-empleadas-en-calidad-del-aire/>, consultado el 26/04/2017.

Storer M., Dummer J., Measurement of breath acetone concentrations by selected ion flow tube mass spectrometry in type 2 diabetes. *J Breath Res.* 2011 Dec;5(4):046011. doi: 10.1088/1752-7155/5/4/046011.

TO-01, EPA, METHOD FOR THE DETERMINATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN AMBIENT AIR USING TENAX® ADSORPTION AND GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS), 1984.

TO-15, EPA, Determination Of Volatile Organic Compounds (VOCs) In Air Collected In Specially-Prepared Canisters And Analyzed By Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS), 1999.

TO-17, EPA, Determination of Volatile Organic Compounds in Ambient Air Using Active Sampling Onto Sorbent Tubes, 1999.

Trujillo Arriaga H. M., La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo. Depto. de Ingeniería Eléctrica, Área de Ingeniería Biomédica, UAM-I.

Universidad de Barcelona, Análisis de la varianza con un factor (ANOVA), [http://www.ub.edu/aplica\\_infor/spss/cap4-7.htm](http://www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap4-7.htm), 02/04/2017.

Walton C., Patel M., The use of a portable breath analysis device in monitoring type 1 diabetes patients in a hypoglycaemic clamp: validation with SIFT-MS data. *J Breath Res.* 2014 Sep;8(3):037108, doi:10.1088/1752-7155/8/3/037108.

Wang Z., Wang C., Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements, *J. Breath Res.* 7 (2013) 037109 (18pp).

Wei Kao K., Che Hsu M., A Sub-ppm Acetone Gas Sensor for Diabetes Detection Using 10 nm Thick Ultrathin InN FETs, *Sensors* 2012, 12(6), 7157-7168; doi:10.3390/s120607157.

Wishart D. S., Jewison T., Guo A. C., Wilson M, Knox C, HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013. Jan 1;41(D1):D801-7. 23161693. <http://www.hmdb.ca/>.

Yan Y., Wang Q., Discovery of potential biomarkers in exhaled breath for diagnosis of type 2 diabetes mellitus based on GC-MS with metabolomics, *RSC Adv.*, 2014,4, 25430-25439, DOI: 10.1039/C4RA01422G.

# INDICE DE FIGURAS TABLAS Y ECUACIONES

---