



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

METABOLÓMICA BASADA EN ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. Martha Elena García Aguilera

Tutor: Dra. Nuria Esturau Escofet

Instituto de Química UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., Agosto 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**METABOLÓMICA BASADA EN ESPECTROSCOPIA DE
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Martha Elena García Aguilera

Tutor: Dra. Nuria Esturau Escofet
Instituto de Química UNAM



Ciudad de México, Agosto 2021

SUSTENTANTE: M. en C. Martha Elena García Aguilera

No. Becario: 295848

TUTORA: Dra. Nuria Esturau Escofet

H. Jurado

- Presidente: Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo
- Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis
- Vocal: Dra. Nury Pérez Hernández
- Vocal: Dr. Hulme Ríos Guerra
- Secretario: Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

La presente Tesis se realizó en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Nuria Esturau Escofet.

El artículo derivado de la estancia doctoral es:

Martha E. Garcia-Aguilera, · Eduardo Rodríguez de San Miguel, · Jocelyn Cruz-Perez, · Lucinda Aguirre-Cruz, Christian M. Ramirez-Alfaro, · Nuria Esturau-Escofet. "NMR-based metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signature of brain death". *Metabolomics*. **2021**, 17:40.

Los resultados derivados del proyecto de investigación se presentaron en:

- 41st Colloquium Spectroscopicum Internationale" (CSI XLI) and 1st Latin-American Meeting on Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LAMLBS) en la modalidad de cartel con el título: "Metabolomic analysis of the cerebrospinal fluid by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals changes in brain death"



- Simposios Internos del Instituto de Química 2018-2020

Se contribuyó con la asesoría técnica de la tesis de licenciatura del alumno Jorge Enrique Sánchez Sánchez, titulada: "Perfil metabolómico basado en Resonancia Magnética Nuclear para la clasificación de mieles mexicanas por origen floral".

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca 295848 para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de la ciencia.

Al Instituto de Química de la UNAM por brindarme los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

A la Dra. Nuria Esturau por sus enseñanzas, el tiempo brindado y sobre todo por su amistad entrañable.

A los miembros del comité tutor: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero y Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo por su asesoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del H. Jurado por sus valiosas observaciones y comentarios de este trabajo.

A la Dra. Ma. Lucinda Aguirre Cruz, Dra. Jocelyn Cruz Pérez y al personal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez por la colaboración en este proyecto.

A la Dra. Beatriz Quiroz por todo su apoyo.

A mi familia por siempre estar, y a Dios por darme tanto.

“Let us be certain of who we want to be. Let us choose for ourselves our path in life, and let us try to strew that path with flowers.”

Émilie Du Châtelet



Tabla de contenido

1. Introducción.....	2
1.1 Estructura de la tesis	3
2. Objetivos.....	5
3. Marco teórico	6
3.1 Muerte encefálica	6
3.2 Líquido cefalorraquídeo	6
3.3 Metabolómica.....	7
3.3.1 Resonancia Magnética Nuclear	8
3.3.2 Quimiometría.....	11
3.4 Metabolómica por RMN en enfermedades neurológicas y ME.....	12
4. Metodología	14
4.1 Sujetos de estudio	14
4.1.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	15
4.2 Toma de muestras.....	15
4.3 Tratamiento de las muestras	15
4.3.1 Reactivos.....	15
4.3.2 Preparación.....	15
4.4 Experimentos de RMN	16
4.5 Identificación de metabolitos.....	17
4.6 Pre-procesamiento de datos	17
4.7 Análisis quimiométrico	18
4.8 Cuantificación de metabolitos y análisis univariante.....	18
4.9 Análisis de rutas metabólicas	18
5. Resultados y Discusión	19



5.1	Espectros de RMN- ¹ H de LCR	19
5.2	Análisis quimiométrico	20
5.3	Cuantificación de metabolitos	23
5.4	Análisis estadístico univariante	25
5.5	Análisis de rutas metabólicas	27
6.	Conclusiones	34
7.	Bibliografía	35





Lista de abreviaturas, acrónimos y simbología

1D NOESY	Espectroscopia Monodimensional de Efecto Nuclear Overhauser (<i>One Dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
RMN- ¹ H	Espectro unidimensional de resonancia magnética nuclear de protón
AAN	Academia Americana de Neurología
B ₀	Campo magnético
D ₂ O	Óxido de deuterio
DM	Diabetes mellitus
HMDB	<i>Human Metabolome Data Base</i>
HTA	Hipertensión arterial
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAP	Presión arterial media
ME	Muerte encefálica
MVA	Análisis multivariante
OPLS-DA	Proyección ortogonal a las estructuras latentes con análisis discriminatorio (<i>Orthogonal Projection to Latent Structures Discriminant Assay</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCO ₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (<i>Partial Least Squares Discriminant Assay</i>)
PO ₂	Presión parcial de oxígeno
Q ²	Coeficiente de predicción
R ² X	Varianza en la matriz X
R ² Y	Varianza asociada a la matriz Y
rf	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SD	Desviación estándar
SNC	Sistema Nervioso Central
TSP	Sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico-d ₄
VIP	Proyección de Variables por su Importancia (<i>Variable of Important Projection</i>)



1. Introducción

Las tecnologías "ómicas" son un conjunto de tecnologías analíticas empleadas en diferentes disciplinas que permiten generar y agrupar información de un sistema biológico con el fin de obtener una visión lo más completa posible del sistema. Entre ellas están la genómica, la proteómica y la metabolómica, que permiten detectar a gran escala los genes, las proteínas y los metabolitos, respectivamente.

La tecnología "ómica" de más reciente aparición es la metabolómica, que es capaz de revelar la respuesta de los sistemas biológicos a la influencia genética, nutricional y ambiental a través del análisis del conjunto de metabolitos, llamado metaboloma. El metaboloma está comprendido por moléculas de pequeño peso molecular (<1,500 Da) que son productos o intermediarios de los procesos químicos-enzimáticos resultados del metabolismo celular presentes en muestras biológicas, como son: suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina y tejido.

La metabolómica tiene el potencial de convertirse en una herramienta de diagnóstico clínicamente útil. En la última década se han reportado estudios del perfil bioquímico que han demostrado la eficacia de la metabolómica en la identificación de biomarcadores asociados con el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de diversas enfermedades.

Existen diferentes plataformas analíticas para realizar metabolómica, las dos principales son la espectrometría de masas (EM) y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Las dos son complementarias y no intercambiables, aunque la RMN es menos sensible, presenta múltiples ventajas ya que no es destructiva, permite la identificación y cuantificación simultánea de metabolitos en mezclas y, la muestra puede ser analizada sin pretratamiento. Por ello la RMN es muy atractiva para la obtención de perfiles de metabolitos.

El problema más común en las ciencias ómicas es el manejo de un número elevado de muestras que contienen miles de variables, y el manejo estadístico debe proporcionar una representación de datos fiable. El análisis multivariante



(MVA) aplicado a problemas químicos es el método más usado para tal objetivo y recibe el nombre de quimiometría.

La adaptación de la quimiometría a la espectroscopía de RMN fue probada en los inicios de los 80's y demostró tener un tremendo potencial en los estudios de metabolómica.

El presente proyecto, resultado de la colaboración con diferentes investigadores pertenecientes al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN), describe el perfil metabólico de muerte encefálica (ME) utilizando el enfoque de metabolómica basada en espectroscopía de RMN-¹H en LCR humano. Los datos espectrales se sometieron a análisis multivariante y revelaron el aumento de veintinueve metabolitos discriminatorios en ME, lo que refleja lo alterado que está el metabolismo en dicha condición.

Los resultados de este estudio contribuirán a una mejor comprensión de los cambios bioquímicos en las vías metabólicas implicadas en la ME.

1.1 Estructura de la tesis

La presente tesis está estructurada en 6 capítulos, a continuación se describe brevemente el contenido de cada uno de ellos:

En el Capítulo 1 se da una Introducción acerca del tema de investigación de la presente tesis y un resumen del contenido, mientras que en el Capítulo 2 se plantean los objetivos de la misma.

En el Capítulo 3, *Marco teórico*, se presenta una revisión general acerca de la ME y el LCR; también se da una introducción a la metabolómica, a la plataforma analítica de RMN y a la quimiometría. Se hace especial hincapié en los estudios de metabolómica por RMN en enfermedades neurológicas.

En el Capítulo 4, *Metodología*, se hace una descripción de los sujetos de estudio, del protocolo de recolección, traslado y almacenamiento de las muestras, del tratamiento de las mismas y de las condiciones experimentales empleadas. Así mismo, se detalla el procedimiento para la identificación de los



metabolitos, el pre-procesamiento de datos, el análisis quimiométrico, la cuantificación de metabolitos, el análisis univariante y el análisis de las rutas metabólicas para la interpretación de resultados.

Posteriormente en el Capítulo 5, *Resultados y Discusión*, se presentan, analizan y discuten los resultados obtenidos del análisis quimiométrico, de la cuantificación de metabolitos, del análisis estadístico univariante y del análisis de las rutas metabólicas.

Como parte final de este trabajo, en el Capítulo 6 se presentan las conclusiones obtenidas del desarrollo de este proyecto.



2. Objetivos

El objetivo general consiste en establecer las diferencias metabólicas entre sujetos con ME y sujetos control a través de la plataforma metabólica basada en RMN de muestras de LCR. Los objetivos específicos son:

- Definir los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes del INNN y establecer el protocolo para la recolección, el almacenamiento y el traslado de muestras de LCR.
- Estandarizar el tratamiento de LCR e implementar, seleccionar y optimizar las secuencias de pulsos, previo a la adquisición de los experimentos de RMN.
- Realizar el análisis quimiométrico de los datos espectrales y la identificación de biomarcadores potenciales.
- Realizar la cuantificación de los metabolitos para evaluar si la diferencia es estadísticamente significativa, y así poder analizar las rutas metabólicas alteradas.



3. Marco teórico

3.1 Muerte encefálica

La ME está definida por *The Uniform Determination of Death Act* como "el cese irreversible de las funciones circulatorias y respiratorias, o el cese irreversible de todas las funciones de todo el cerebro, incluido el tronco encefálico"¹. En general, la ME en adultos es una consecuencia del daño cerebral anóxico, daño cerebral traumático, hemorragia subaracnoidea, desregulación metabólica o accidente cerebrovascular isquémico^{2,3}. Estas condiciones provocan diversas alteraciones inflamatorias, hormonales, metabólicas y hemodinámicas⁴⁻⁶. Debido a la complejidad de la fisiopatología y a las implicaciones legales, el proceso para la certificación de ME incluye estudios confirmatorios como electroencefalografía, doppler transcraneal y angiografía⁵. De acuerdo con la Academia Americana de Neurología (AAN) los estándares médicos para la determinación de ME enfatizan 3 hallazgos clínicos necesarios para confirmarla: coma (con una causa conocida), ausencia de reflejos del tronco encefálico y apnea⁷.

La fisiopatología de la ME se ha investigado extensamente, ya que la comprensión de los eventos bioquímicos que ocurren en la ME es fundamental por diversas razones importantes como el diagnóstico oportuno para maximizar el éxito de trasplante de órganos y para definir el tratamiento terapéutico con un paciente^{8,9}.

3.2 Líquido cefalorraquídeo

El LCR es un fluido biológico que circula en el cerebro y la columna vertebral, protege al cerebro de cambios en la presión arterial y de traumatismos. El LCR se produce y circula en los ventrículos y el espacio subaracnoideo del cerebro y la columna vertebral para transportar, administrar, filtrar y/o eliminar nutrientes, productos celulares y neurotransmisores. La composición del LCR depende del transporte activo de metabolitos desde la sangre y la secreción del cerebro, por lo tanto, el metaboloma del LCR refleja la condición bioquímica del Sistema Nervioso Central (SNC). Por estas razones, el análisis de LCR es tan importante en



la investigación biomédica y la práctica clínica para el diagnóstico y seguimiento de la progresión de enfermedades neurológicas¹⁰⁻¹³.

3.3 Metabolómica

La metabolómica es la disciplina ómica de más reciente aparición y es capaz de revelar la respuesta de los sistemas biológicos a la influencia genética, nutricional y ambiental a través del análisis del metaboloma en un momento o condición en específico¹⁴. El metaboloma es la colección de compuestos de bajo peso molecular (incluidos aminoácidos, lípidos y ácidos orgánicos) productos o intermediarios (endógenos o exógenos) de los procesos químico-enzimáticos que resultan del metabolismo celular en un tejido, organismo o biofluidos como suero, plasma, LCR y orina¹⁵⁻¹⁸.

El objetivo de la metabolómica es identificar si existe una diferencia significativa entre los grupos de muestras en estudio usando técnicas analíticas para visualizar tendencias y correlaciones mediante la construcción de modelos predictivos con métodos estadísticos¹⁹.

De acuerdo al objetivo del estudio, la metabolómica puede ser abordada desde dos enfoques distintos: metabolómica no dirigida, que es el análisis de todo el perfil; y metabolómica dirigida, que involucra el análisis de metabolitos específicos¹⁹⁻²¹.

Entre las plataformas analíticas más utilizadas en metabolómica se encuentra la espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas de gases o de líquidos. La EM más utilizada es en tándem, por su alta sensibilidad y selectividad²². Sin embargo, necesita de un tratamiento previo de la muestra y es una técnica destructiva.

Otra plataforma es la RMN, cuyo uso en metabolómica ha aumentado sustancialmente en los últimos años debido a los avances tecnológicos, como el uso de sondas criogénicas que mejoran su sensibilidad. Si bien otras técnicas son más sensibles en comparación con la RMN, la RMN es altamente reproducible, se puede cuantificar una amplia gama de metabolitos simultáneamente con una



mínima o nula preparación o separación de la muestra, no es destructiva y el perfil de metabolitos se puede adquirir en un breve período de tiempo^{15-17,23-33}.

3.3.1 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia de RMN es una herramienta analítica que se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias (rf) por parte de núcleos atómicos con momento magnético de espín nuclear no nulo ($\mu \neq 0$). Dicha absorción ocurre a frecuencias únicas que dependen del tipo de núcleo y del ambiente químico en el que se encuentra y se manifiesta en presencia de un campo magnético (B_0) intenso. En ausencia de B_0 , los espines nucleares se orientan al azar y son equivalentes en energía. Sin embargo, cuando se coloca un B_0 se pueden orientar en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la de B_0 , en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . Al estar alineados con B_0 describen un movimiento de precesión a una frecuencia proporcional a dicho campo, llamada frecuencia de Larmor (Ecuación 1). A temperatura ambiente, el número de espines α supera levemente al número de espines β de acuerdo a la distribución de Boltzmann (Ecuación 2). Sólo los núcleos en el estado α son capaces de absorber radiación externa de rf, lo cual se traduce en una baja sensibilidad de la técnica.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

Ecuación 1. Frecuencia de Larmor. En donde ω_0 es la frecuencia de Larmor, γ es la constante giromagnética y B_0 es el campo magnético.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T}$$

Ecuación 2. Distribución de Boltzmann. En donde N_α es el número de núcleos en el estado de mínima energía, N_β es el número de núcleos en el estado de mayor energía, ΔE es la diferencia de energía, k_B es la constante de Boltzmann ($1.38066 \times 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-2}$) y T es la temperatura.

Los núcleos entran en resonancia cuando se irradia la muestra con un pulso de rf de la misma frecuencia a la que precesan. En este punto, los espines



nucleares realizan una transición del estado de menor al de mayor energía, y simultáneamente los espines del estado de mayor energía realizan una transición al de menor energía. La señal en espectroscopia por RMN es el resultado de la diferencia entre esa energía absorbida y la energía emitida, por lo tanto es proporcional a la diferencia de población entre los dos estados. Al regresar estas señales a su estado de equilibrio son registradas como la intensidad de señal respecto al tiempo, y posteriormente mediante la transformada de Fourier (FT-RMN), se convierten dichos datos en una gráfica de intensidad de señal en función de la frecuencia. Dicha gráfica es conocida como "espectro de RMN".

A través del desplazamiento químico (δ), el acoplamiento espín-espín y el área bajo la curva, el espectro de RMN da información del tipo y número de núcleos no equivalentes en una muestra. El δ es determinado por el entorno químico del núcleo, por tanto da información de los grupos funcionales. El acoplamiento espín-espín se da cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de núcleos interactúan, lo que ocasiona un desdoblamiento de las señales en multipletes. La distancia entre picos de los multipletes medida en Hz es conocida como constante de acoplamiento (J) y da información estructural. El número relativo de núcleos se puede conocer con el área bajo la curva.

Los componentes fundamentales del espectrómetro de RMN son:

1. Imán superconductor (B_0).
2. Sonda con bobinas (excitación y detección de los espines nucleares).
3. Transmisor de pulsos de rf (generación de frecuencia).
4. Detector (medición de la absorción de energía de rf por parte de la muestra).
5. Amplificador (aumento de la respuesta detectada).
6. Filtro digital (conversión de la señal).
7. Computadora (generación de gráficas que forman el espectro de RMN).

El núcleo del hidrógeno, ^1H , es el núcleo más ampliamente estudiado en RMN, debido a que su constante giromagnética es muy grande y a que su abundancia en la naturaleza es del 99.9%.



Considerando la naturaleza y la complejidad de las muestras estudiadas en metabolómica, es necesaria la supresión de la señal del disolvente utilizado o del agua que contienen las muestras. Al ser esta señal la más intensa en los espectros de RMN, impide la observación de las señales más pequeñas correspondientes a los metabolitos que están en menor concentración. Una de las formas más utilizadas para aminorar este efecto y obtener espectros interpretables es la presaturación de la señal del disolvente y/o del agua.

3.3.1.1 Secuencia de pulsos 1D NOESY-presat

La transmisión de las radiofrecuencias se hace a partir de secuencias de pulsos. Un pulso consiste en la aplicación de una radiofrecuencia por un periodo de tiempo definido (τ).

La secuencia de pulsos 1D NOESY-presat (*1 Dimension Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy with Presaturation*) es muy utilizada en el análisis de muestras biológicas ya que además de permitir una supresión eficiente de la señal de agua y dar como resultado espectros con una buena línea base, tiene una baja necesidad de optimización y evita la pérdida de la señal de los protones intercambiables. Esta secuencia de pulsos utiliza la diferencia de tiempo de relajación longitudinal (T_1) entre los núcleos de los metabolitos y el agua para suprimir la señal del disolvente. Al ser el tiempo de relajación del agua mayor que el de los metabolitos cancela el componente magnético del agua con el segundo pulso de 90° (Figura 1) ³⁴.

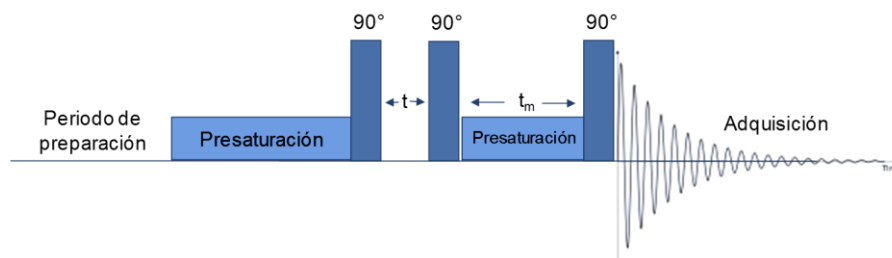


Figura 1. Secuencia de pulsos 1D NOESY-presat.



3.3.2 Quimiometría

Teniendo en cuenta la gran cantidad de datos obtenidos en un espectro de RMN y su naturaleza multivariante, la extracción de información importante se convierte en un desafío continuo. Por lo tanto, es importante realizar MVA en el conjunto de datos metabólicos para comparar patrones y encontrar características relevantes que distingan entre las clases de muestras^{23,27,35,36}. A estos métodos se les conoce como quimiométricos.

La quimiometría se define como la disciplina química que utiliza matemáticas y estadística, entre otros métodos que emplean la lógica, para extraer la máxima cantidad de información significativa de los datos disponibles³⁷.

Existen dos enfoques diferentes en estadística multivariante para el reconocimiento de patrones: los métodos no supervisados y los supervisados. Los primeros generalmente son el primer paso en el MVA, permiten reducir, explorar y visualizar los datos y encontrar patrones y valores atípicos. Una de las técnicas exploratorias y no supervisadas más útiles para excluir valores atípicos e identificar la variante dominante en el conjunto de datos no asociada con el efecto biológico es el análisis de componentes principales (PCA). Por otro lado, los métodos supervisados utilizan la clasificación de las muestras para maximizar la separación entre grupos, y así generar patrones o tendencias. Una de las técnicas no supervisadas más común es el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), en donde se utiliza la pertenencia a clases para maximizar la discriminación entre grupos para un efecto biológico en particular. Otra técnica supervisada ampliamente utilizada es la proyección ortogonal a las estructuras latentes con análisis discriminatorio (OPLS-DA) para eliminar la variación sistemática en X que es ortogonal a Y . Ambas técnicas se utilizan para seleccionar las variables relevantes y facilitar la identificación de metabolitos importantes^{16-18,24,30,32,38-40}.



3.4 Metabolómica por RMN en enfermedades neurológicas y ME

A nivel mundial, el estudio de enfermedades a través de la metabolómica en el LCR es cada vez más común, por ejemplo se ha utilizado en la descripción del perfil metabólico de pacientes con Alzheimer⁴¹, esclerosis múltiple⁴²⁻⁴⁵, enfermedad de moyamoya⁴⁶, rabia^{47,48}, meningitis^{49,50,51}, enfermedades inflamatorias del SNC⁵², enfermedad de Parkinson⁵³, linfoma⁵⁴, síndrome de Guillain Barré⁵⁵ y migraña⁵⁶.

La mayoría de los estudios de metabolómica relacionados con ME se han enfocado en el intervalo post-mortem debido a su importancia en las investigaciones forenses y en el trasplante de órganos. Se ha analizado en modelos animales^{57,58} y en tejidos humanos^{59,12}. En cuanto al tiempo transcurrido desde la muerte, se han llevado a cabo estudios de los perfiles bioquímicos del LCR⁶⁰⁻⁶³ y en tejidos cerebrales⁶⁴.

Hasta donde sabemos, no existe un estudio metabolómico de ME en LCR humano basado en RMN-¹H. El único que hemos encontrado es un análisis dirigido de Stefani et al., en donde utilizaron HPLC para cuantificar glutamato, esta técnica analítica requiere la derivatización de la muestra para su análisis lo que es laborioso e incrementa el tiempo de análisis. En este mismo estudio, se analizaron otros tres posibles biomarcadores pronósticos del desenlace neurológico después de un traumatismo craneoencefálico severo: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de glia (GDNF) y lactato con kits comerciales específicos para cada uno. Estos cuatro compuestos pueden ser posibles biomarcadores. En el caso del glutamato, el neurotransmisor excitatorio predominante en el cerebro, puede volverse excitotóxico a altas concentraciones extracelulares y con frecuencia se observa un incremento de este metabolito después de un traumatismo craneoencefálico grave, cuya magnitud se correlaciona con un aumento de la presión intracraneal y resultados clínicos deficientes⁶⁵⁻⁶⁹. Inmediatamente después, hay una afluencia neuronal de calcio y un desequilibrio iónico, que provocan despolarización de la membrana y



una mayor liberación de glutamato. Como consecuencia, las bombas de la membrana actúan para restaurar rápidamente los gradientes aumentando así el flujo de glucosa a través de la vía glucolítica y la producción de lactato^{66,70}. El aumento de las concentraciones de lactato cerebral extracelular después de una lesión cerebral traumática puede reflejar un aumento de la respuesta metabólica astrocítica a concentraciones elevadas de glutamato. Además, los estudios experimentales han demostrado que en respuesta al aumento de los niveles de glutamato extracelular, los astrocitos y las neuronas liberan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la célula glial (GDNF). Ambas neurotrofinas modulan la actividad de la neurotransmisión glutamatérgica, que incluye la liberación sináptica neuronal y la actividad/expresión de transportadores de captación de glutamato astrocíticos^{71,72}. Tanto el lactato como el glutamato son metabolitos que pueden ser detectados por RMN, sin embargo, BDNF y GDNF son proteínas que suelen ser detectadas por otros métodos analíticos.

El análisis de Stefani et al. correlacionó el aumento de lactato y glutamato con la predicción de ME dentro de los 3 días posteriores al ingreso del paciente al hospital. En este estudio se monitoreó a 20 pacientes, de los cuales 6 fallecieron y 14 sobrevivieron⁷³.



4. Metodología

4.1 Sujetos de estudio

Se realizó un estudio transversal entre 2017 y 2018 con pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. En este estudio se incluyen un total de 24 sujetos con ME (9 ictus; 10 tumores cerebrales, 2 hemorragia craneal espontánea, 1 trombosis venosa cerebral, 1 edema cerebral y 1 estado epiléptico superrefractario) y 22 sujetos control (sujetos sin ME: 7 cefalea, 11 encefalitis, 3 esclerosis múltiple, 1 neuromielitis óptica). Las características de los sujetos con ME se muestran en la Tabla 1. Los sujetos control fueron 7 mujeres y 15 hombres, entre 18-48 años (mediana 25.5 años). El consentimiento informado para participar en este estudio se obtuvo de los familiares del sujeto y/o directamente de los sujetos de acuerdo con la Declaración de Helsinki. En el momento en que se aplicó el formulario de consentimiento, también se interrogó a los familiares sobre el estilo de vida del sujeto y las enfermedades preexistentes. El Comité de Ética institucional aprobó este protocolo (proyecto número 68/17 y 60/18).

Tabla 1. Datos demográficos y características clínicas de los sujetos con ME.

Variables	ME (n=20)
Edad, años (mediana, \pm rango)	41 (19-61)
Género, (femenino/masculino)	15/9
MAP (mmHg)	115 \pm 25/69 \pm 15
PO ₂ (mmHg)	95 \pm 28
PCO ₂ (mmHg)	36 \pm 7
Comorbilidades	
Grupo I (DM y/o HTA)	8
Grupo II (Tumores cerebrales)	8
Grupo III (Desórdenes autoinmunes)	1
Grupo IV (Sin antecedentes patológicos)	2
Grupo V (Toxicomanías)	2
Grupo VI (Epilepsia)	3
Tiempo de toma de muestra después de ME	1-3 horas



4.1.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Los criterios de inclusión para el grupo de ME fueron: ME clínica determinada con los criterios de la AAN³. Los criterios de inclusión para el grupo control fueron sujetos vivos. Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron pacientes con cualquier tipo de infección.

4.2 Toma de muestras

Se recolectó un mL de LCR de los sujetos con ME durante el drenaje ventricular o mediante punción lumbar, y de los sujetos control mediante punción lumbar convencional como parte del examen clínico de rutina. Las muestras de LCR se transportaron al laboratorio a 4°C y se centrifugaron a 3,000 g en una centrífuga Eppendorf durante 10 min a la misma temperatura para obtener sobrenadantes libres de células y se almacenaron a -70°C hasta el análisis de RMN para preservar la estabilidad de la muestra.

4.3 Tratamiento de las muestras

4.3.1 Reactivos

Los reactivos NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y el óxido de deuterio (D_2O) (D, 99,98%) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Mientras que la sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico- d_4 (TSP) fue de Merck (Darmstadt, Alemania).

4.3.2 Preparación

Las muestras de LCR se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, las muestras se desproteinizaron utilizando una membrana con corte de 10 kDa (Sartorius). Antes de su uso, los filtros se lavaron 3 veces con agua y luego con D_2O para eliminar el glicerol contenido en las membranas de ultrafiltración. Posteriormente se mezclaron 400 μl de LCR ultrafiltrado con 200 μl de buffer de fosfato de sodio 153.1 mM preparado en D_2O pH 7.0 (pD 7.4) con TSP 0.25 mM (proporcionando una referencia de desplazamiento químico de 0.00 ppm). Las muestras ya preparadas se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm.



En este punto es importante mencionar que a pesar de que no todos los estudios de LCR llevan a cabo la desproteínización, de acuerdo con algunos autores y en nuestra experiencia, este paso es muy importante debido a que el TSP (estándar interno para la cuantificación) se une a las proteínas de la muestra, como la albúmina, lo que produce una señal ensanchada/reducida y conduce a concentraciones de metabolitos más altas^{74,75}.

4.4 Experimentos de RMN

Los experimentos de RMN se adquirieron a 298.15 K en un espectrómetro Bruker Avance III (Figura 2) de 16.44 Teslas (699.96 MHz para ^1H), provisto de una sonda criogénica de triple sintonía con bobina de gradientes en el **eje z** para tubos de 5 mm y un muestreador automático "Sample Jet". La adquisición de los experimentos se realizó de manera automática con el software IconNMR (Bruker).



Figura 2. Equipo Bruker Modelo Avance III de 16.44 Teslas (700 MHz para ^1H).

Los espectros de RMN- ^1H se adquirieron utilizando la secuencia de pulsos unidimensional estándar utilizando el primer incremento de la secuencia de pulsos 1D NOESY-presat (secuencia de pulsos Bruker noesypr1d), en la que la frecuencia de agua residual se irradió durante el tiempo de relajación de 4.0 s y durante el



tiempo de mezclado de 10 ms. Se adquirieron un total de 256 acumulaciones en 72k puntos de datos sobre un ancho espectral de 14 kHz con un tiempo de adquisición de 2.5 s. Las FID (*Free Induction Decay*) se multiplicaron por una función exponencial con un factor de ancho de línea de 0.3 Hz antes de la transformada de Fourier. Los espectros de RMN- ^1H se corrigieron manualmente para la distorsión de la fase y la línea base utilizando el software Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx Inc). Los desplazamientos químicos de RMN- ^1H se referenciaron a la señal de TSP a 0.0 ppm. Además, se realizaron experimentos de RMN 2D en muestras representativas para confirmar las asignaciones de los desplazamientos químicos, incluidas la espectroscopia de correlación ^1H - ^1H (COSY), la espectroscopia de coherencia cuántica simple heteronuclear (HSQC) y la correlación de enlace múltiple heteronuclear (HMBC) utilizando las secuencias de pulso estándar de Bruker.

4.5 Identificación de metabolitos

Se utilizó el software Chenomx NMR Suite v. 8.4 (Chenomx Inc, Edmonton, Canadá) para identificar los metabolitos presentes en las muestras según la ubicación de las resonancias individuales en los espectros. La confirmación de la asignación de algunos metabolitos se llevó a cabo considerando los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y los patrones de multiplicidad reportados en la literatura^{31,76,10} y en el *Human Metabolome Data Base* (HMDB)⁷⁷.

4.6 Pre-procesamiento de datos

El preprocesamiento de datos previo al MVA se realizó utilizando el software Chenomx. Cada espectro de RMN- ^1H se subdividió en cajas o *bins* homogéneos de 0.02 ppm en el rango de -0.5 ppm a 13.5 ppm. Los espectros procesados se normalizaron al área de la señal de TSP en 0.0 ppm. Se excluyó la señal residual de agua (4.69 – 5.01 ppm).



4.7 Análisis quimiométrico

La matriz de datos con las integrales normalizadas se sometió a MVA en el software SIMCA 16.0.1.7928 (Umetrics, Sartorius Stedim Biotech) utilizando el método de escalado Pareto. Inicialmente, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) de los datos espectrales de RMN para visualizar la estructura general de cada conjunto de datos y para identificar cualquier anomalía dentro del conjunto de datos. Posteriormente, para identificar las diferencias entre los grupos, se realizaron los análisis PLS-DA y OPLS-DA utilizando el método de escalado Pareto y validación cruzada. La calidad de cada modelo fue determinada con el parámetro de bondad de ajuste (R^2) y con el parámetro de bondad de predicción y la fracción de la variación total predicha por un componente (Q^2). La determinación de los metabolitos responsables de la separación entre los grupos control y ME se realizó mediante la gráfica de *loadings* y con la proyección de variables por su importancia (VIP) de cada *bin* en el modelo para identificar los biomarcadores⁴⁸.

4.8 Cuantificación de metabolitos y análisis univariante

Se utilizó el software Chenomx para cuantificar los metabolitos utilizando la concentración del TSP como referencia.

El análisis estadístico univariante se realizó con el software Metaboanalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca) y con Matlab versión R2020b (The MathWorks Inc.) con la extensión del Test de permutaciones (<https://github.com/lrkrol/permutationTest>).

4.9 Análisis de rutas metabólicas

Se utilizó el software MetaboAnalyst 5.0 con la base de datos de la enciclopedia de vías de genes y genomas de Kioto (KEGG; www.genome.jp/kegg/) para identificar las vías metabólicas más relevantes enriquecidas significativamente en los datos metabolómicos. Se realizó el test hipergeométrico y el de *relative betweenness centrality*. Ambos resultados se graficaron simultáneamente para mostrar las vías más significativas en términos del análisis de enriquecimiento y análisis topológico⁷⁸⁻⁸⁰.



5. Resultados y Discusión

5.1 Espectros de RMN-¹H de LCR

En la Figura 3 se muestran los espectros típicos de RMN-¹H de 700 MHz con las asignaciones de metabolitos representativos de muestras de LCR de ME y de un control. El análisis cualitativo de los espectros permitió la identificación de 63 metabolitos. Los metabolitos asignados comprenden aminoácidos (p. ej., histidina, lisina, alanina, glutamina, valina, leucina, prolina y fenilalanina), otros metabolitos endógenos (p. ej., lactato, 2-hidroxiacetato, creatina y piruvato), entre otros. Al comparar el espectro control con el de ME se observó un aumento en las señales de algunos metabolitos como lactato, glutamina, alanina, leucina, creatina, fenilalanina e histidina entre otros.

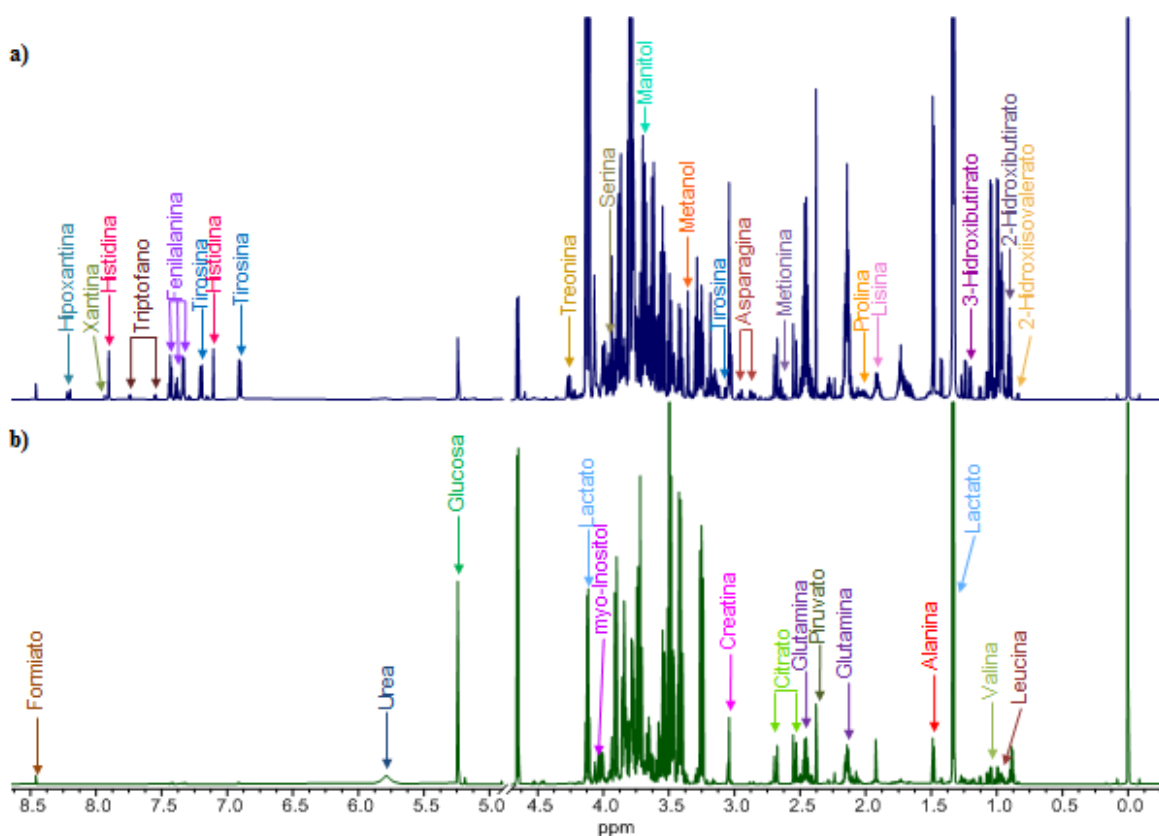


Figura 3. Espectros representativos de ¹H-NMR de 700 MHz de muestra de LCR a pH 7.0 con algunas asignaciones de metabolitos, a) ME y b) control. Se ha eliminado la región espectral del agua.



5.2 Análisis quimiométrico

Los 46 espectros de RMN-1H de las muestras de LCR se sometieron a MVA. Se utilizaron el OPLS-DA (Figura 4), y los test Hotelling's T2 y DModX (Figura 5) con un nivel de confianza del 95% para buscar agrupaciones y eliminar valores atípicos extremos. Las cuatro muestras que salen de la elipse de confianza en el modelo OPLS-DA tienen los valores más altos en los test Hotelling's T2 y DModX, con base en ello se consideraron como anómalas. Por lo anterior, el grupo de ME original se redujo a 20 al excluir estos 4 casos.

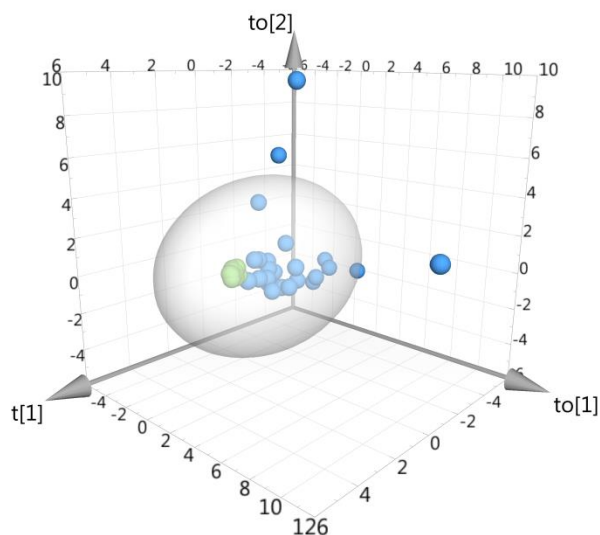


Figura 4. Gráfico del modelo de OPLS-DA con 3 componentes de 22 controles (verde) y 24 sujetos con ME (azul) basado en los espectros RMN de las muestras de LCR. Se observa la clara distinción entre los dos grupos y muestra 4 atípicos (muestras fuera de la elipse del 95% confianza).

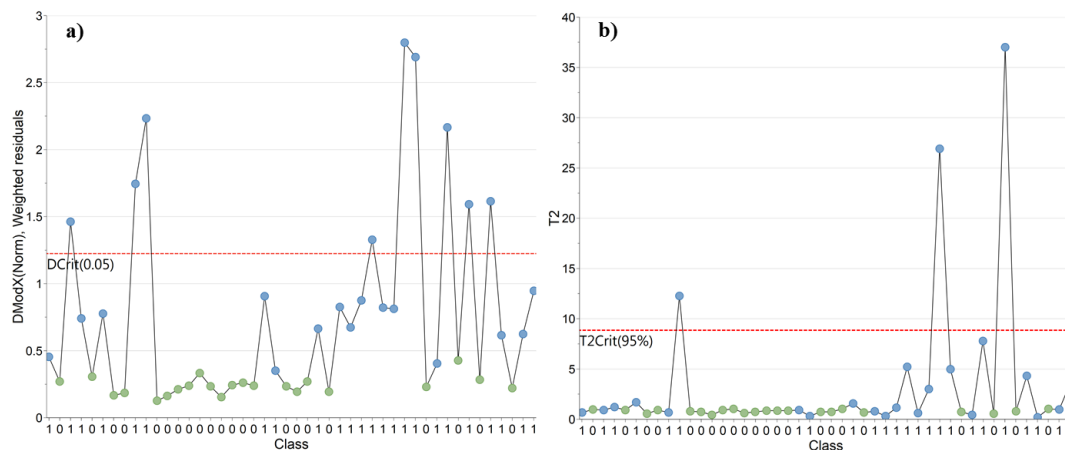


Figura 5. a) *DModX* y b) *Hotelling's T2* del modelo OPLS-DA de 22 controles (verde) y 24 con ME (azul). La línea roja representa un nivel de confianza del 95%. Las muestras que están por arriba del nivel de confianza tanto en el OPLS-DA como en el *DModX* y en el *Hotelling's T2* son consideradas anómalas.

Después de eliminar los valores atípicos, se construyó una nueva matriz con 22 controles y 20 muestras de ME, se aplicó un MVA para evaluar la agrupación e identificar variaciones entre el control y el ME. En primer lugar, se utilizó PCA para explorar y visualizar variaciones y posibles patrones en el conjunto de datos (Figura 6a), y el modelo resultante contenía 5 componentes principales que explican el 91,40% de la variación espectral. El PC1 fue capaz de capturar el 54.2% de la variación espectral y PC2 el 21.7%, mientras que PC3, PC4 y PC5 explicaron menos del 10% cada uno. Todas las muestras control se encuentran muy próximas, como se muestra en el gráfico de scores de los dos primeros componentes principales (puntos verdes Figura 6a). Por el contrario, se observó una fuerte dispersión entre los datos de las muestras de ME (puntos azules Figura 6a).

Después de realizar el PCA, se empleó el método supervisado OPLS-DA que permite separar la variación en los espectros asociada al grupo al que pertenece (ME o control). Un modelo de 1+1+0 variables latentes fue capaz de capturar el 73.3% de la variación espectral (R^2X), el 71.2% de la variación del grupo (R^2Y) y la bondad de la predicción fue del 63.5% (Q^2) (Figura 6b). Para establecer los *bins* responsables de la separación entre los grupos control y ME, se consideraron los *loadings* (Figura 6c) y los VIP con valores $> 1.5^{48}$ (Tabla 2).

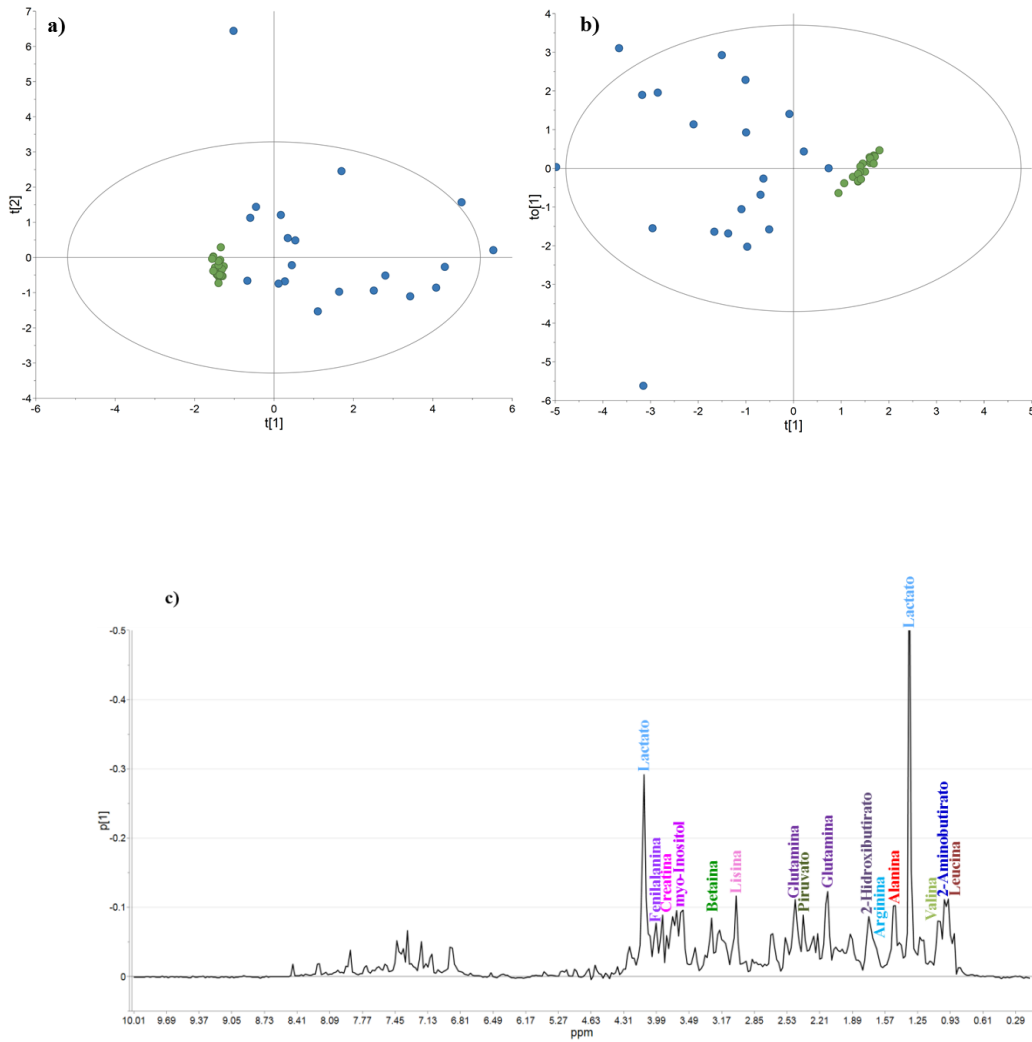


Figura 6. a) Scores del PCA de los datos espectrales de RMN. b) Scores del OPLS-DA de los datos espectrales de RMN. Ambos modelos son de 22 controles (verde) y 20 sujetos con ME (azul). c) Gráfico de loadings del OPLS-DA en donde se muestran las regiones espectrales de RMN responsables de la diferencia entre los dos grupos con la identificación de algunos metabolitos principales.



Tabla 2. Proyección de variables por su importancia (VIP) de los bins con valores > 1.5. Metabolitos responsables de la separación entre los sujetos control y ME.

Puntajes VIP	Bin [ppm]	Metabolitos
13.4	1.33-1.31	Lactato
6.11939	4.11-4.09	Lactato
3.35623	4.13-4.11	Lactato
3.20781	1.31-1.29	Lactato
2.57638	2.13-2.11	Glutamina, Glutamato
2.43618	3.03-3.01	Creatina, Lisina
2.38661	4.09-4.07	Lactato
2.35031	0.95-0.93	Leucina
2.34024	2.45-2.43	Glutamina
2.32746	0.99-0.97	Valina
2.19841	2.15-2.13	Glutamina, Glutamato
2.14374	1.47-1.45	Alanina, Sacaropina
2.13386	1.49-1.47	Alanina
2.11799	0.97-0.95	2-Aminobutirato
2.00692	3.55-3.53	myo-inositol, Glicina, Glicerol
1.99578	3.61-3.59	myo-inositol, Valina
1.94529	3.57-3.55	Glicerol, Glicina
1.86702	2.37-2.35	Piruvato, Glutamato, Prolina, 3-Hidroxiisovalerato
1.86687	3.93-3.91	Creatina
1.82054	3.65-3.63	Glicerol
1.81528	1.73-1.71	Leucina, Lisina, 2-Hidroxiobutirato, Arginina
1.77152	3.27-3.25	myo-inositol, Fenilalanina, Betaína, Arginina
1.67928	1.05-1.03	Valina
1.6641	1.03-1.01	Valina
1.61848	3.99-3.97	Fenilalanina, 2-Hidroxiobutirato, Asparagina, Histidina
1.58875	2.47-2.45	Glutamina
1.57973	2.43-2.41	Glutamina
1.5494	3.63-3.61	myo-inositol
1.50204	1.71-1.69	Leucina, Lisina, 2-Hidroxiobutirato, Arginina

5.3 Cuantificación de metabolitos

Los metabolitos cuyas señales se encontraban en los bins con un valor de VIP > 1.5 marcaron la diferencia entre los grupos, por lo que estos metabolitos fueron cuantificados. En total se cuantificaron 36 metabolitos (Tabla 3).



Tabla 3. Concentraciones de los metabolitos cuantificados con diferencia estadísticamente significativa al comparar los sujetos control y ME (p -value < 0.05). Los datos son presentados con la medias y su desviación estándar (SD). En la última columna se muestra el número de identificación en el HMDB.

Metabolito	Media \pm SD (μ M)		HMDB
	Control	ME	
2-Aminobutirato*	3 \pm 1	16 \pm 13	HMDB0000452
2-Hidroxibutirato*	26 \pm 11	106 \pm 44	HMDB0000008
2-Hidroxisovalerato	7 \pm 7	11 \pm 4	HMDB0000407
3-Hidroxisovalerato*	4 \pm 2	7 \pm 4	HMDB0000754
Acetoacetato	9 \pm 5	58 \pm 126	HMDB0000060
Acetona	19 \pm 10	139 \pm 315	HMDB0001659
Alanina*	29 \pm 10	229 \pm 205	HMDB0000161
Arginina*	17 \pm 10	42 \pm 28	HMDB0000517
Asparagina*	4 \pm 2	37 \pm 35	HMDB0000168
Aspartato	2 \pm 2	24 \pm 55	HMDB0000191
Betaína*	2 \pm 1	13 \pm 17	HMDB0000043
Citrato	181 \pm 37	450 \pm 233	HMDB0000064
Creatina*	39 \pm 6	125 \pm 103	HMDB0000064
Glutamato*	4 \pm 2	37 \pm 104	HMDB0000148
Glutamina*	399 \pm 98	1035 \pm 660	HMDB0000641
Glicerol*	182 \pm 33	327 \pm 205	HMDB0000131
Glicina*	7 \pm 3	124 \pm 149	HMDB0000123
Histidina*	10 \pm 4	79 \pm 90	HMDB0000177
Isoleucina	4 \pm 2	33 \pm 37	HMDB0000172
Lactato*	1405 \pm 152	6907 \pm 3230	HMDB0000190
Leucina*	11 \pm 4	157 \pm 181	HMDB0000687
Lisina*	22 \pm 4	135 \pm 135	HMDB0000182
Metionina	4 \pm 1	35 \pm 35	HMDB0000696
myo-inositol*	113 \pm 30	217 \pm 187	HMDB0000211
Fenilalanina*	7 \pm 1	87 \pm 84	HMDB0000159
Prolina*	3 \pm 2	65 \pm 83	HMDB0000162
Piruvato*	71 \pm 28	241 \pm 77	HMDB0000243
Treonina	28 \pm 10	154 \pm 131	HMDB0000167
Triptofano	1 \pm 1	17 \pm 19	HMDB0000929
Tirosina	9 \pm 2	76 \pm 69	HMDB0000158
Valina*	15 \pm 6	199 \pm 209	HMDB0000883

*Metabolitos estadísticamente significativos en la diferenciación entre grupo control y ME, con un punto de corte de VIP > 1.5.



5.4 Análisis estadístico univariante

Se evaluó la significancia estadística de la diferencia en las concentraciones de los metabolitos entre ambos grupos utilizando la prueba univariante no paramétrica de Test de permutaciones, en la que se consideró un p -value < 0.05 como punto de corte para establecer la significancia estadística. Por lo tanto, utilizando los *loadings* y los VIP junto con el análisis univariante, se seleccionaron 21 metabolitos significativos responsables de la separación entre los grupos control y ME (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de los metabolitos responsables de la separación entre el grupo control y ME. Los metabolitos se muestran en orden de importancia (VIP).

Metabolito	Media \pm SD (μm)	
	Control	ME
Lactato	1405 \pm 152	6907 \pm 3230
Glutamato	4 \pm 2	37 \pm 104
Glutamina	399 \pm 98	1035 \pm 660
Creatina	39 \pm 6	125 \pm 103
Lisina	22 \pm 4	135 \pm 135
Leucina	11 \pm 4	157 \pm 181
Valina	15 \pm 6	200 \pm 209
Alanina	29 \pm 10	229 \pm 205
2-Aminobutirato	3 \pm 1	16 \pm 13
myo-inositol	113 \pm 30	217 \pm 187
Glicina	7 \pm 3	125 \pm 149
Glicerol	182 \pm 33	327 \pm 205
Piruvato	71 \pm 28	241 \pm 77
Prolina	3 \pm 2	65 \pm 83
3-Hidroxiisovalerato	4 \pm 2	7 \pm 4
2-Hidroxi butirato	26 \pm 11	106 \pm 45
Arginina	17 \pm 10	42 \pm 28
Fenilalanina	7 \pm 1	87 \pm 84
Betaína	2 \pm 1	13 \pm 17
Asparagina	4 \pm 2	37 \pm 35
Histidina	10 \pm 4	79 \pm 90

De los 36 metabolitos cuantificados, 31 se encuentran elevados en ME, incluidos los metabolitos cuyas señales se encontraban en los *bins* con un valor de VIP > 1.5 responsables de la separación entre los grupos control y ME (Figura 7).

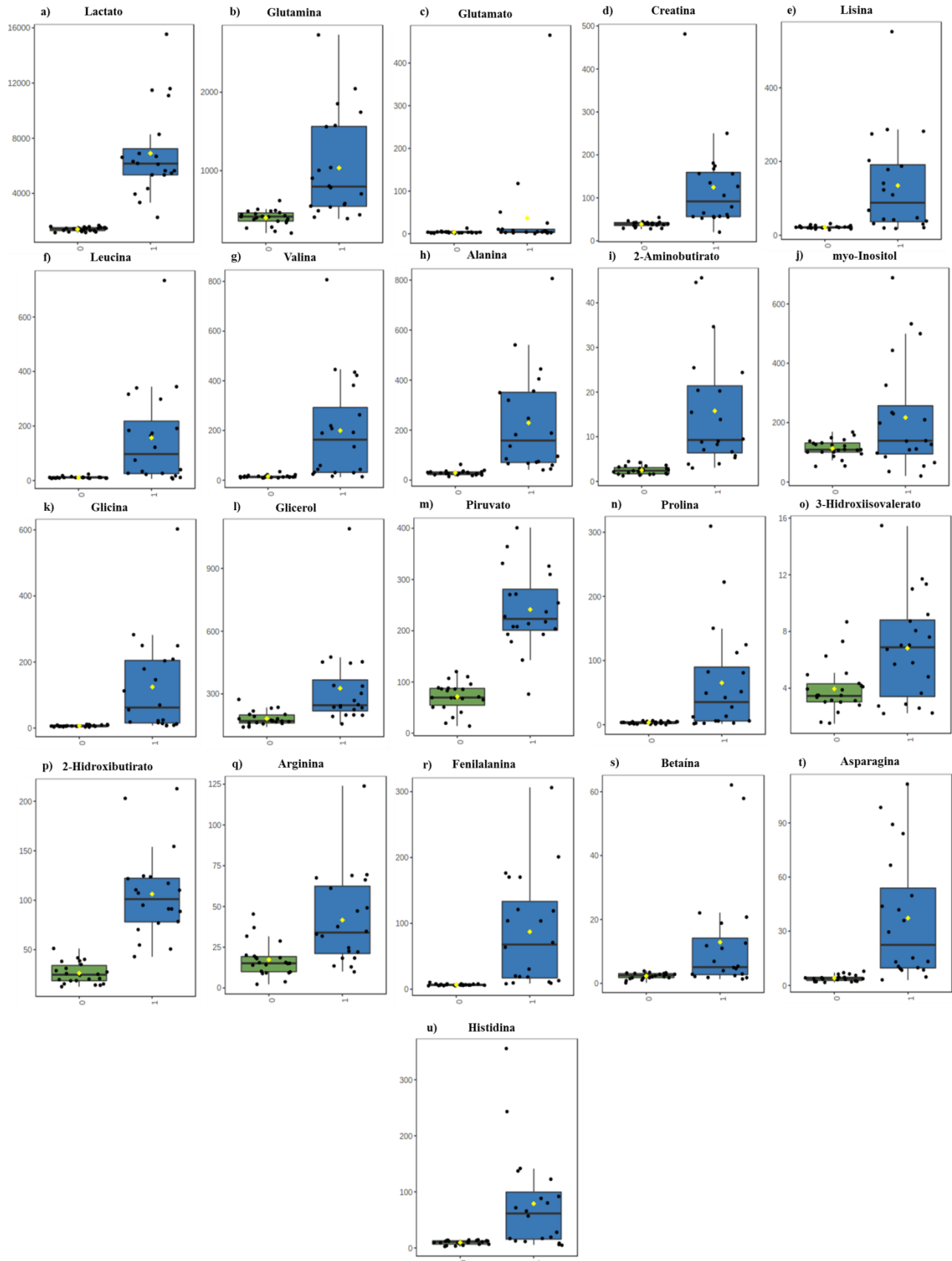




Figura 7. Diagramas de caja y bigotes de la cuantificación de los metabolitos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) responsables de la separación entre los grupos control y ME. En el eje x se muestra el grupo control (0) y el grupo ME (1), mientras que en el eje y se muestra la concentración de los metabolitos. La parte inferior y superior de la caja son el cuartil más bajo (Q1) y el más alto (Q3) respectivamente, la banda cerca de la mitad de la caja es la mediana de la concentración (Q2). El bigote superior se encuentra en el menor de los valores de concentración máxima y $Q3 + 1.5 \cdot IQR$ (Rango intercuartílico), mientras que el bigote inferior se encuentra en el mayor de los valores de concentración mínima y $Q1 - 1.5 \cdot IQR$. El punto amarillo es la media de la concentración. a) Lactato, b) Glutamina, c) Glutamato, d) Creatina, e) Lisina, f) Leucina, g) Valina, h) Alanina, i) 2-aminobutirato, j) myo-inositol, k) Glicina, l) Glicerol, m) Piruvato, n) Prolina, o) 3-hidroxiisovalerato, p) 2-hidroxiobutirato, q) Arginina, r) Fenilalanina, s) Betaína, t) Asparagina y u) Histidina en los grupos control y ME. Los metabolitos se muestran en orden de importancia (VIP).

5.5 Análisis de rutas metabólicas

Los metabolitos responsables de la separación entre los grupos control y ME, se introdujeron en el software MetaboAnalyst 5.0. para identificar los patrones bioquímicamente significativos. Las vías metabólicas alteradas se muestran en la Figura 8. Los resultados indican que los metabolitos alterados por ME pertenecen a 35 rutas bioquímicas, 11 de ellas se identificaron como significativamente enriquecidas ($p\text{-value} < 0.05$), entre las cuales 8 vías tenían valores de impacto relativamente grandes (> 0.1) (Tabla 5). Las vías más afectadas cuya principal actividad se da en el cerebro son: metabolismo de glutamina y glutamato con 2 aciertos (glutamina y glutamato); metabolismo de alanina, aspartato y glutamato con 5 aciertos (asparagina, alanina, glutamato, glutamina y piruvato); metabolismo de glicina, serina y treonina con 4 aciertos (betaína, glicina, creatina y piruvato); metabolismo del piruvato con 2 aciertos (lactato y piruvato); metabolismo de arginina y prolina con 5 aciertos (arginina, creatina, prolina, glutamato y piruvato); metabolismo de la histidina con 2 aciertos (glutamato e histidina); biosíntesis de arginina con 3 aciertos (glutamato, arginina y glutamina) y metabolismo de glioxilato y dicarboxilato con 4 aciertos (glicina, glutamato, piruvato y glutamina). Algunas otras vías metabólicas enumeradas en la Tabla 5 tienen origen extracerebral debido a la estrecha interrelación entre el LCR y el espacio extracelular del cerebro, y al flujo dinámico con los latidos del corazón, la postura y la respiración. La relación entre el plexo coroideo y el LCR, considerado la tercera circulación, realiza muchas funciones que incluyen proporcionar



flotabilidad, nutrición y eliminación de productos de desecho endógenos para el cerebro mediante el flujo masivo hacia los sistemas venoso y linfático, y mediante sistemas de transporte de reabsorción mediados por portadores en el plexo coroideo. El LCR también presenta muchos compuestos exógenos para el metabolismo o la eliminación, limpiando indirectamente el espacio extracelular del cerebro contribuyendo a un medio interno estable⁸¹.

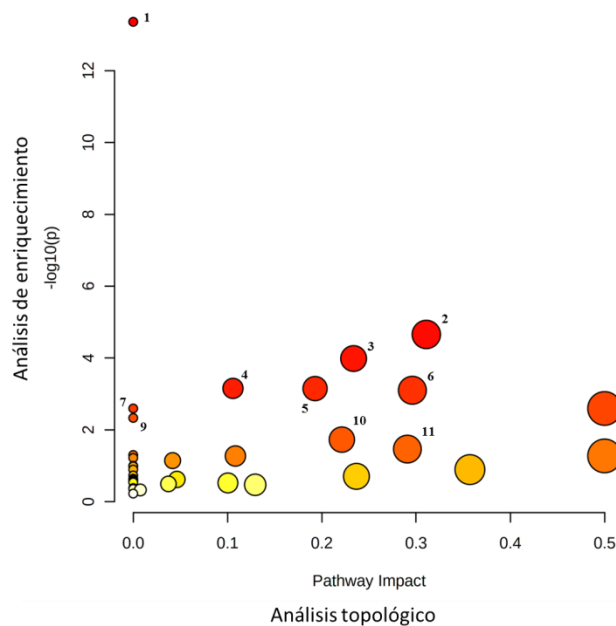


Figura 8. Análisis de las vías metabólicas alteradas entre el grupo control y el grupo ME. El eje x representa el análisis topológico (pathway impact) y el eje y representa el análisis de enriquecimiento ($-\log(p)$). Las siguientes son las 11 principales vías estadísticamente significativas identificadas: 1: Biosíntesis de aminoacil-tRNA; 2: metabolismo de alanina, aspartato y glutamato; 3: metabolismo de la arginina y la prolina; 4: metabolismo de glioxilato y dicarboxilato; 5: biosíntesis de arginina; 6: metabolismo de glicina, serina y treonina; 7: metabolismo del nitrógeno; 8: metabolismo de glutamina y glutamato; 9: Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina; 10: metabolismo de la histidina y 11: metabolismo del piruvato. El color y el tamaño de cada ruta son determinados de acuerdo al p-value y al valor de pathway impact, respectivamente.

Tabla 5. Resultados del análisis de rutas metabólicas en las muestras de LCR de los grupos control y ME.

Nombre de la ruta metabólica	Total*	Aciertos*	p^*	$-\log(p)^*$	Holm p^*	FDR*	Incidencia*
Biosíntesis de aminoacil-tRNA	48	12	4.3715E-14	13.359	3.6721E-12	3.6721E-12	0
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	28	5	0.000022104	4.6555	0.0018346	0.00092837	0.3109
Metabolismo de arginina y prolina	38	5	0.00010344	3.9853	0.0084824	0.0028964	0.23378



Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	32	4	0.00070109	3.1542	0.056788	0.01107	0.10582
Biosíntesis de arginina	14	3	0.00070973	3.1489	0.056788	0.01107	0.19289
Metabolismo de glicina, serina y treonina	33	4	0.00079075	3.102	0.062469	0.01107	0.29611
Metabolismo del nitrógeno	6	2	0.0025392	2.5953	0.19806	0.026662	0
Metabolismo de glutamina y glutamato	6	2	0.0025392	2.5953	0.19806	0.026662	0.5
Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina	8	2	0.0046628	2.3314	0.35437	0.043519	0
Metabolismo de histidina	16	2	0.018719	1.7277	1	0.15724	0.22131
Metabolismo de piruvato	22	2	0.034316	1.4645	1	0.26205	0.29082
Metabolismo de galactosa	27	2	0.050071	1.3004	1	0.32093	0
Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano	4	1	0.053153	1.2745	1	0.32093	0.5
Metabolismo de glutatión	28	2	0.053488	1.2717	1	0.32093	0.10839
Metabolismo de porfirinas y clorofila	30	2	0.060566	1.2178	1	0.33917	0
Metabolismo de cisteína y metionina	33	2	0.071756	1.1441	1	0.37672	0.04179
Degradación de valina, leucine e isoleucina	40	2	0.1002	0.99914	1	0.4835	0
Metabolismo de ascorbato y aldarato	8	1	0.10361	0.98461	1	0.4835	0
Metabolismo de biotina	10	1	0.12786	0.89325	1	0.53703	0
Metabolismo de fenilalanina	10	1	0.12786	0.89325	1	0.53703	0.35714
Metabolismo de butanoato	15	1	0.1858	0.73095	1	0.74321	0
Metabolismo de glicerolípidos	16	1	0.19694	0.70566	1	0.75195	0.23676
Biosíntesis de pantotenato y CoA	19	1	0.22949	0.63923	1	0.80661	0
Metabolismo de selenocompuestos	20	1	0.24006	0.61968	1	0.80661	0
Ciclo del citrato (ciclo TCA)	20	1	0.24006	0.61968	1	0.80661	0.04634
Metabolismo de beta-alanina	21	1	0.25049	0.60121	1	0.80928	0
Metabolismo de propanoato	23	1	0.27095	0.56712	1	0.84294	0
Degradación de lisina	25	1	0.29087	0.53631	1	0.8708	0
Glucólisis / Gluconeogénesis	26	1	0.30063	0.52196	1	0.8708	0.10044
Señalización fosfatidilinositol	28	1	0.31978	0.49515	1	0.89538	0.03736
Metabolismo de inositol fosfato	30	1	0.33843	0.47054	1	0.91703	0.12939
Metabolismo de pirimidina	39	1	0.41648	0.38041	1	1	0
Metabolismo de tirosina	42	1	0.44049	0.35607	1	1	0



Biosíntesis de ácidos biliares primarios	46	1	0.47104	0.32694	1	1	0.00758
Metabolismo de purina	65	1	0.59571	0.22496	1	1	0

***Total** es el número total de compuestos en la ruta; **Aciertos** es el número de metabolitos que coincide de los datos cargados; **Raw p** es el p -value original calculado del análisis de enriquecimiento; **Holm p** es el p -value ajustado mediante el método de Holm-Bonferroni; **FDR** es el p -value ajustado usando el *False Discovery Rate* e **Incidencia** el valor de incidencia o de impacto de la ruta calculado del análisis topológico.

Es importante señalar que los 3 principales metabolitos responsables de la separación entre los grupos control y ME (lactato, glutamina y glutamato) están involucrados en 7 de las 8 vías más impactadas, excepto en la del metabolismo de la serina y treonina. Esta vía incluye la creatina, que es el cuarto metabolito principal responsable de la separación.

Los modelos multivariantes estadísticamente significativos separaron a los sujetos con ME de los controles y revelaron metabolitos discriminatorios. Al igual que Stefani et al.⁷³, encontramos que los pacientes con ME mostraron concentraciones significativamente mayores de lactato. Los niveles altos de lactato pueden deberse a una función mitocondrial alterada, lo que refleja una disminución del metabolismo neuronal y, en general, se interpreta como un marcador de glucólisis anaeróbica^{82,83}. Se ha observado un aumento en la concentración de lactato en otras enfermedades neurológicas como la rabia^{47,48}, meningitis bacteriana⁴⁹, neuromielitis óptica⁴⁴, entre otras.

Al igual que Stefani et al.⁷³, proponemos que la alteración de la reactividad de la presión cerebrovascular y la disminución de la perfusión y oxigenación del cerebro conducen a anomalías metabólicas relacionadas con el lactato. Además, que a pesar de la presencia de un suministro de glucosa satisfactorio, la producción de lactato puede aumentar significativamente para satisfacer las necesidades metabólicas del cerebro. Teniendo en cuenta la alta disponibilidad extracelular de lactato, las neuronas aparentemente no son capaces de utilizar el lactato como sustrato, contribuyendo a la muerte del paciente.

En relación con el aumento de glutamato, esto podría involucrar diferentes factores asociados con la sinapsis glutamatérgica tripartita y podría contribuir al deterioro de la función cerebral después de una lesión cerebral traumática grave,



como la interrupción del soporte energético, desencadenando rápidamente la muerte neuronal.

La mayoría de los autores de estudios clínicos concluyen que un aumento en la concentración de glutamato extracelular en el cerebro es una señal de un deficiente funcionamiento neuronal, malos pronósticos en la evolución del paciente y de ME^{68,69,84,85}.

Al mismo tiempo de su función excitadora en el SNC, el glutamato estimula la glucólisis en los astrocitos, la utilización de glucosa y la producción de lactato, que se transporta a las neuronas⁸⁶.

Además del aumento de lactato, nuestro estudio detectó altos niveles de glutamina en las muestras de LCR de ME. Las señales de RMN de glutamina y glutamato se encuentran en los mismos *bins*, por lo que ambos metabolitos se consideraron como responsables de la separación entre grupos.

El glutamato, el neurotransmisor excitatorio más abundante del cerebro humano, se forma en la neurona presináptica a partir de la glutamina por la glutaminasa y se almacena en vesículas sinápticas. Es liberado en la hendidura sináptica por la neurona presináptica y es captado por los astrocitos a través de transportadores de aminoácidos excitatorios. Estos últimos son dependientes de sodio y eliminan el glutamato rápidamente de la hendidura sináptica para mantener las concentraciones de glutamato muy bajas y prevenir la sobreexcitación postsináptica, que podría resultar en la muerte celular. El amoníaco cerebral, tanto exógeno como endógeno (generado principalmente a partir de la glutaminasa cerebral, glutamato deshidrogenasa y por la actividad del ciclo de la enzima purina nucleótida), es utilizado por los astrocitos para convertir el glutamato en glutamina mediante la glutamina sintetasa vía amidación^{87,88}. Allí, se sintetiza 1 mol de glutamina usando 1 mol de glutamato, 1 mol de ATP y 1 mol de amoníaco. La glutamina se descarga rápidamente a la hendidura sináptica desde los astrocitos por difusión facilitada. La glutamina se transporta a la neurona presináptica donde la glutaminasa cataliza la formación de glutamato disponible para la neurotransmisión. En las neuronas presinápticas, se libera amoníaco de la glutamina por la glutaminasa activada por fosfato. Las enzimas glutamina



sintetasa y glutaminasa participan en este ciclo que opera entre la neurona presináptica, la hendidura sináptica y el astrocito para mantener concentraciones efectivas de ambos metabolitos en condiciones fisiológicas normales. A pesar de que el glutamato se sintetiza rápidamente a partir de la glucosa en el tejido neural, el proceso de recarga del neurotransmisor, una vez liberado, implica el ciclo glutamina-glutamato, un mecanismo clave para el control de la neurotransmisión glutamatérgica en el cerebro humano⁸⁹⁻⁹³.

La glutamina juega un papel vital en la función cerebral, en la desintoxicación y regulación de las actividades neurotransmisoras de su precursor. Además, es bien reconocida la importancia de la glutamina como forma de transporte de nitrógeno amínico^{94,95}.

El aumento de glutamina en este estudio reveló algunas alteraciones en la función normal del ciclo glutamina-glutamato. Una posible causa podría ser una alteración metabólica llamada hiperamonemia. La hiperamonemia estimula la síntesis de glutamina a través de la glutamina sintetasa, por posible inhibición de la glutaminasa e inhibición de la recaptación de glutamato por el astrocito. Un aumento en el flujo de calcio y sodio hacia las neuronas postsinápticas es causado por una activación prolongada de los receptores ionotrópicos de glutamato. Esto aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies de nitrógeno (RNS) debido a la disfunción mitocondrial, lo que conduce al daño celular o a la muerte. Una sobreexcitación de los receptores de glutamato de N-metil-d-aspartato (NMDA) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) induce excitotoxicidad (daño neuronal). La excitotoxicidad puede ser modulada por receptores metabotrópicos para glutamato. En caso de hiperamonemia, estos receptores son inactivados^{7,96-99}.

Los aminoácidos responsables de la separación entre los grupos control y ME, se encuentran aumentados en el grupo de ME. Esto puede ser debido a que, a pesar del rápido intercambio entre el cerebro y la sangre, se concentran al máximo en el tejido cerebral¹⁰⁰. Otra causa puede ser la relación entre la condición clínica de los pacientes y las funciones que desempeñan dichos metabolitos, ya que los aminoácidos y sus derivados están involucrados en la



transmisión sináptica como neurotransmisores y neuromoduladores. Son particularmente importantes ya que juegan un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de circuitos neuronales y en el crecimiento y supervivencia neuronal en el cerebro. La neurotransmisión es una función específica de los aminoácidos en el SNC. Estos se unen específicamente a la membrana postsináptica, donde activan o inhiben los receptores debido a la despolarización o a la hiperpolarización. Los aminoácidos son una importante fuente de energía porque los dicarboxílicos están directamente relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico¹⁰⁰.

Estudios experimentales de los efectos de los aminoácidos ramificados (BCAA) sobre el metabolismo energético en la corteza cerebral han demostrado que todos los BCAAs reducen el metabolismo energético e inhiben la actividad de la cadena respiratoria. La alteración en el metabolismo mitocondrial da como resultado falla energética y modifica el metabolismo del piruvato y aumenta el lactato. Las consecuencias del cambio en el metabolismo de los aminoácidos incluyen alteraciones de los neurotransmisores derivados de aminoácidos (GABA, glutamato y serotonina). También se presenta la alteración de la síntesis de proteínas. La falla de energía probablemente inicia una cascada hacia la muerte celular que comienza con un aumento en el calcio citosólico¹⁰¹.

Todos los metabolitos responsables de la separación entre los grupos control y ME se encuentran aumentados en ME. Es probable que haya metabolitos cuya concentración disminuya, sin embargo, puede ser que la sensibilidad y el tipo de moléculas que la RMN detecta no haya permitido observarlos.



6. Conclusiones

En este trabajo se establecieron las diferencias metabólicas entre sujetos con ME y sujetos control a través de la implementación de la plataforma metabólica basada en RMN de muestras de LCR.

En concreto se pueden citar como conclusiones de la tesis:

- Se confirmó la importancia del lactato y el glutamato en la patofisiología de ME, los dos biomarcadores utilizados por Stefani et al. para predecir ME después de una lesión cerebral traumática grave. El aumento de estos dos metabolitos y de la glutamina marcó la principal diferencia entre los grupos.
- Se encontraron otros metabolitos como creatina, lisina, leucina, valina, alanina, 2-aminobutirato, mioinositol, glicina, glicerol, piruvato, prolina, 3-hidroxiisovalerato, 2-hidroxibutirato, arginina, fenilalanina, betaína, asparagina e histidina como parte de la huella metabólica de ME.
- Se identificaron las vías metabólicas más relevantes enriquecidas significativamente con los datos metabólicos.

Además de implementar la plataforma analítica de RMN para el estudio de LCR e identificar la huella metabólica asociada con ME de los pacientes del INNN, este proyecto sienta las bases para construir modelos para la identificación de marcadores de diagnóstico y pronóstico en otros padecimientos neurológicos.



7. Bibliografía

1. National Conference of Commissioners on Uniform State Laws. Uniform Determination of Death Act - Model Statute [Internet]. 1980; 8(5):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502147>
2. Nathan S, Greer DM. Brain death. *Semin. Anesth. Perioper. Med. Pain* 2006; 25(4):225–231.
3. Wijdicks EFM, Varelas PN, Gronseth GS, Greer DM. Evidence-based guideline update: Determining brain death in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2011; 76(3):1911–1918.
4. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2009; 53(4):425–435.
5. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome [Internet]. *Transplant. Rev.* 2012; 26(2):54–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tre.2011.10.001>
6. Spinello IM. Brain Death Determination. *J. Intensive Care Med.* 2015; 30(6):326–337.
7. Rosenberg J, Alter M, Byrne T, Daube J, Franklin G, Frishberg B, Goldstein M, Greenberg M, Lanska D, Mishra S, Odenheimer G, Paulson G, Pearl R, Stevens J, Special article practice parameters for determining brain death in adults. *Neurology* 1996; 1012–1014.
8. Brasil S, Bor-Seng-Shu E, De-Lima-Oliveira M, Milena A, Manoel T, Luca B, Bernardo W, Role of computed tomography angiography and perfusion tomography in diagnosing brain death: A systematic review [Internet]. *J. Neuroradiol.* 2016; 43(2):133–140. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurad.2015.07.006>
9. Güzel Y, Koç Z, Mifil H, Köm M, Özer B, Özercan I, Balci T, Brain death scintigraphy and pathology results in a rat model. *Exp. Clin. Transplant.* 2014;



- 12(2):143–147.
10. Mandal R, Guo A, Chaudhary K, Liu P, Yallou F, Dong E, Aziat F, Wishart D, Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: A comprehensive and quantitative update. *Genome Med.* 2012; 4(4):1–11.
 11. Mochel F. Nuclear magnetic resonance of cerebrospinal fluid: The neurometabolome. *Methodol. Metabolomics Exp. Strateg. Tech.* 2010; 257–270.
 12. Romeo M, Espina V, Lowenthal M, Espina B, Petricoin E, Liotta L, CSF proteome: A protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev. Proteomics* 2005; 2(1):57–70.
 13. Stoop M, Coulier L, Rosenling T, Shi S, Smolinska A, Buydens L, Ampt K, Stingl C, Dane A, Muilwijk B, Luitwieler R, Sillevs S, Hintzen R, Bischoff R, Wijmenga S, Hankemeier T, Van Gool A, Luider T, Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples. *Mol. Cell. Proteomics* 2010; 9(9):2063–2075.
 14. Harker M, Coulson H, Fairweather I, Taylor D, Daykin C, Study of metabolite composition of eccrine sweat from healthy male and female human subjects by ¹H NMR spectroscopy. *Metabolomics* 2006; 2(3):105–112.
 15. Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003; 7(5):648–654.
 16. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29(11):1181–1189.
 17. Ren S, Hinzman A, Kang E, Szczesniak R, Lu L, Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics* 2015; 11(6):1492–1513.
 18. Weljie A, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky C, Targeted profiling:



- Quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data. *Anal. Chem.* 2006; 78(13):4430–4442.
19. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2013; 4(5):e201301009.
 20. Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief. Bioinform.* 2006; 7(2):128–139.
 21. Blekherman G, Laubenbacher R, Cortes D, Mendes P, Torti F, Akman S, Torti S, Shulaev V, Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics* 2011; 7(3):329–343.
 22. N. Gowda DD. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges [Internet]. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1198:3–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 23. Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2008; 27(3):228–237.
 24. Zhang S, Gowda GAN, Ye T, Raftery D. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *Physiol. Behav.* 2016; 176(1):100–106.
 25. Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. Measuring the metabolome: Current analytical technologies. *Analyst* 2005; 130(5):606–625.
 26. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2005; 24(4):285–294.
 27. Ellinger JJ, Chylla RA, Ulrich EL, Markley JL. Databases and Software for NMR-Based Metabolomics *James. Curr. Metabolomics* 2013;1(1)
 28. Emwas A, Saccenti E, Gao X, McKay R, dos Santos V, Roy R, Wishart D, Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ^1H -NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics* 2018; 14(3)



29. Emwas A, Roy R, McKay R, Tenori L, Saccenti E, Nagana G, Raftery D, Alahmari F, Jaremko L, Jaremko M, Wishart D, Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* 2019; 9(7)
30. Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* 2013; 9(5):1048–1072.
31. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 2000; 13(3):129–153.
32. Mussap M, Antonucci R, Noto A, Fanos V. The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clin. Chim. Acta* 2013; 426:127–138.
33. Rubtsov D, Jenkins H, Ludwig C, Easton J, Viant M, Günther U, Griffin J, Hardy N, Proposed reporting requirements for the description of NMR-based metabolomics experiments. *Metabolomics* 2007; 3(3):223–229.
34. Mckay RT. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.* 2011; 38 A(5):197–220.
35. Long FH. Multivariate Analysis for Metabolomics and Proteomics Data. *Proteomic Metabolomic Approaches to Biomark. Discov.* 2013; 299–311.
36. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* 2012; 1(1):92–107.
37. Massart DL, Hopke PK. Chemometrics and Distributed Software. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1985; 25(3):308–313.
38. Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: Mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst* 2002; 127(12):1549–1557.
39. Eriksson L, Antti H, Gottfries J, Holmes E, Johansson E, Lindgren F, Long I, Lundstedt T, Trygg J, Wold S, Using chemometrics for navigating in the large



- data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm). *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 380(3 SPEC.ISS.):419–429.
40. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome Res.* 2007; 6(2):469–479.
 41. Cruz T, Balayssac S, Gilard V, Martino R, Vincent C, Pariente J, Malet-Martino M, ¹H NMR Analysis of Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease Patients: An Example of a Possible Misinterpretation Due to Non-Adjustment of pH. *Metabolites* 2014; 4(1):115–128.
 42. Cocco E, Murgia F, Lorefice L, Barberini L, Poddighe S, Frau J, Fenu G, Coghe G, Murru M, Murru R, Del Carratore F, Atzori L, Marrosu M, ¹H-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* 2016; 3(1):1–9.
 43. Dickens A, Larkin J, Griffin J, Cavey A, Matthews L, Turner M, Wilcock G, Davis B, Claridge T, Palace J, Anthony D, Sibson N, A type 2 biomarker separates relapsing-remitting from secondary progressive multiple sclerosis. *Neurology* 2014; 83(17):1492–1499.
 44. Kim H, Jeong I, Hyun J, Kong B, Kim H, Park S, Metabolomic profiling of CSF in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder by nuclear magnetic resonance [Internet]. *PLoS One* 2017; 12(7):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0181758>
 45. Reinke S, Broadhurst D, Sykes B, Baker G, Catz I, Warren K, Power C, Metabolomic profiling in multiple sclerosis: Insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult. Scler.* 2014; 20(10):1396–1400.
 46. Jeon J, Yun T, Jin X, Cho W, Son Y, Bang J, Kang H, Wan Oh C, Kim J, Park S, ¹H-NMR-Based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid from adult bilateral moyamoya disease: Comparison with unilateral moyamoya disease and atherosclerotic stenosis. *Med. (United States)* 2015; 94(17):e629.
 47. Condori RE, David D, Encarnacion R, Fatteh N. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid from Humans Treated for Rabies. 2016; 12(1):481–490.



48. O'Sullivan A, Willoughby R, Mishchuk D, Alcarraz B, Cabezas-Sanchez C, Condori R, David D, Encarnacion R, Fatteh N, Fernandez J, Franka R, Hedderwick S, McCaughey C, Ondrush J, Paez-Martinez A, Rupprecht C, Velasco-Villa A, Slupsky C, Metabolomics of cerebrospinal fluid from humans treated for rabies. *J. Proteome Res.* 2013; 12(1):481–490.
49. Chatterji T, Singh S, Sen M, Singh A, Maurya P, Husain N, Srivastava J, Mandal S, Roy R, Comprehensive ¹H NMR metabolic profiling of body fluids for differentiation of meningitis in adults. *Metabolomics* 2016; 12(8):1–14.
50. Chatterji T, Singh S, Sen M, Singh A, Agarwal G, Singh , Srivastava J, Singh A, Srivastava R, Roy R, Proton NMR metabolic profiling of CSF reveals distinct differentiation of meningitis from negative controls. *Clin. Chim. Acta* 2017; 469:42–52.
51. Li Z, Du B, Zheng X, Jia H, Xing A, Sun Q, Liu F, Zhang Z, Li J, Zhang J, Cerebrospinal fluid metabolomic profiling in tuberculous and viral meningitis: Screening potential markers for differential diagnosis [Internet]. *Clin. Chim. Acta* 2017; 466:38–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.002>
52. French C, Willoughby R, Pan A, Wong S, Foley J, Wheat L, Fernandez J, Encarnacion R, Ondrush J, Fatteh N, Paez A, David D, Javaid W, Amzuta I, Neilan A, Robbins G, Brunner A, Hu W, Mishchuk D, Slupsky C, NMR metabolomics of cerebrospinal fluid differentiates inflammatory diseases of the central nervous system. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(12):1–17.
53. Wu J, Wuolikainen A, Trupp M, Jonsson P, Marklund S, Andersen P, Forsgren L, Öhman A, NMR analysis of the CSF and plasma metabolome of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Metabolomics* 2016; 12(6)
54. Graça G, Desterro J, Sousa J, Fonseca C, Silveira M, Serpa J, Carvalho T, da Silva M, Gonçalves L, Identification of putative biomarkers for leptomenigeal invasion in B-cell non-Hodgkin lymphoma by NMR metabolomics. *Metabolomics* 2017; 13(11):1–11.



55. Park S, Kim J, Kim H, Yoon B, Ji D, Lee C, Kim H, Kim K, Shin H, Park S, Lee D, Integrative metabolomics reveals unique metabolic traits in Guillain-Barré Syndrome and its variants [Internet]. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37572-w>
56. Zielman R, Postma R, Verhoeven A, Bakels F, Van Oosterhout W, Meissner A, Van Den Maagdenberg A, Terwindt G, Mayboroda O, Ferrari M, Metabolomic changes in CSF of migraine patients measured with ¹H-NMR spectroscopy [Internet]. *Mol. Biosyst.* 2016; 12(12):3674–3682. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6MB00424E>
57. Gonzalez-Riano C, Tapia-González S, García A, Muñoz A, DeFelipe J, Barbas C, Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 2017; 222(6):2831–2853.
58. Mora-Ortiz M, Trichard M, Oregioni A, Claus SP. Thanatometabolomics: introducing NMR-based metabolomics to identify metabolic biomarkers of the time of death. *Metabolomics* 2019; 15(3):1–11.
59. Pesko B, Weidt S, McLaughlin M, Wescott D, Torrance H, Burgess K, Burchmore R, Postmortomics: The Potential of Untargeted Metabolomics to Highlight Markers for Time since Death. *Omi. A J. Integr. Biol.* 2020; 24(11):649–659.
60. Arroyo A, Rosel P, Marron T. Cerebrospinal fluid: Postmortem biochemical study. *J. Clin. Forensic Med.* 2005; 12(3):153–156.
61. Girela E, Villanueva E, Irigoyen P, Girela V, Hernández-Cueto C, Peinado J, Free amino acid concentrations in vitreous humor and cerebrospinal fluid in relation to the cause of death and postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 2008; 53(3):730–733.
62. Swain R, Kumar A, Sahoo J, Lakshmy R, Gupta S, Bhardwaj D, Pandey R, Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *J. Forensic Leg. Med.* 2015; 36:144–148.
63. Takata T, Kitao T, Miyaishi S. Relationship between post-mortem interval and creatine concentration in vitreous humour and cerebrospinal fluid. *Aust. J.*



- Forensic Sci. 2014; 46(2):160–165.
64. Ith M, Bigler P, Scheurer E, Kreis R, Hofmann L, Dirnhofer R, Boesch C, Observation and identification of metabolites emerging during postmortem decomposition of brain tissue by means of in situ ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 2002; 48(5):915–920.
 65. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* (80-.). 1989; 244(4906):798–800.
 66. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton S, Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92(16):7162–7166.
 67. Bullock R, Zauner A, Woodward J, Myseros J, Choi S, Ward J, Marmarou A, Young H, Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J. Neurosurg.* 1998; 89(4):507–518.
 68. Koura S, Doppenberg E, Marmarou A, Choi S, Young H, Bullock R, Relationship between Excitatory Amino Acid Release and Outcome after Severe Human Head Injury. *Acta Neurochir. Suppl.* 1998; 1998(SUPPL. 71):244–246.
 69. Chamoun R, Suki D, Gopinath S, Goodman J, Robertson C, Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 2010; 113(3):564–570.
 70. H. Zetterberg, D. Smith KB. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 9(4):201–210.
 71. Almeida R, Manadas B, Melo C, Gomes J, Mendes C, Grãos M, Carvalho R, Carvalho A, Duarte C, Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* 2005; 12(10):1329–1343.
 72. Farrand A, Gregory R, Scofield M, Helke K, Boger H, Effects of aging on glutamate neurotransmission in the substantia nigra of Gdnf heterozygous



- mice Ariana. *Neurobiol. Aging* 2015; 36(3):1569–1576.
73. Stefani M, Modkovski R, Hansel G, Zimmer E, Kopczynski A, Muller A, Strogulski N, Rodolphi M, Carteri R, Schmidt A, Oses J, Smith D, Portela L, Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2017; 4(6):392–402.
 74. Engelke U, Kremer B, Kluijtmans L, van der Graaf M, Morava E, Loupatty F, Wanders R, Moskau D, Loss S, van den Bergh E, Wevers R, NMR spectroscopic studies on the late onset form of 3-methylglutaconic aciduria type I and other defects in leucine metabolism. *NMR Biomed.* 2006; 19(2):271–278.
 75. Wevers R, Engelke U, Wendel U, De Jong J, Gabreels F, Heerschap A, Standardized method for high-resolution ¹H-NMR of cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 1995; 41(5):744–751.
 76. Mailliet S, Vion-Dury J, Confort-Gouny S, Nicoli F, Lutz N, Viout P, Cozzone P, Experimental protocol for clinical analysis of cerebrospinal fluid by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *Brain Res. Protoc.* 1998; 3(2):123–134.
 77. Wishart D, Lewis M, Morrissey J, Flegel M, Jeroncic K, Xiong Y, Cheng D, Eisner R, Gautam B, Tzur D, Sawhney S, Bamforth F, Greiner R, Li L, The human cerebrospinal fluid metabolome. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008; 871(2):164–173.
 78. Xia J, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat. Protoc.* 2011; 6(6):743–760.
 79. Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2016; 2016(September):14.10.1-14.10.91.
 80. Xia J, Wishart DS, Valencia A. MetPA: A web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics* 2011; 27(13):2342–2344.
 81. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the



- cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp. Neurol.* 2015; 273:57–68.
82. Brodersen P, Jorgensen EO. Cerebral blood flow and oxygen uptake, and cerebrospinal fluid biochemistry in severe coma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1974; 37(4):384–391.
 83. DeSalles A, Kontos H, Becker D, Yang M, Ward J, Moulton R, Gruemer H, Lutz H, Maset A, Jenkins L, Prognostic significance of ventricular CSF lactic acidosis in severe head injury. *J. Neurosurg.* 1986; 65(5):615–624.
 84. Ankarcrona M, Dypbukt J, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton S, Nicotera P, Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15(4):961–973.
 85. Madeira C, Vargas-Lopes C, Otávio Brandão C, Reis T, Laks J, Panizzutti R, Ferreira S, Elevated glutamate and glutamine levels in the cerebrospinal fluid of patients with probable Alzheimer's disease and depression. *Front. Psychiatry* 2018; 9(NOV):1–8.
 86. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91(22):10625–10629.
 87. Cooper AJL, Mora SN, Cruz NF, Gelbard AS. Cerebral Ammonia Metabolism in Hyperammonemic Rats. *J. Neurochem.* 1985; 44(6):1716–23.
 88. Cooper AJL, Lai JCK. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem. Pathol.* 1987; 6(1–2):67–95.
 89. Lebon V, Petersen K, Cline G, Shen J, Mason G, Dufour S, Behar K, Shulman G, Rothman D, Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: Elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J. Neurosci.* 2002; 22(5):1523–1531.
 90. Maciejewski PK, Rothman DL. Proposed cycles for functional glutamate



- trafficking in synaptic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 2008; 52(4–5):809–825.
91. Patel A, De Graaf R, Mason G, Rothman D, Shulman R, Behar K, The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102(15):5588–5593.
 92. Ramadan S, Lin A, Stanwell P. Glutamate and glutamine: A review of in vivo MRS in the human brain. *NMR Biomed.* 2013; 26(12):1630–1646.
 93. Rothman D, de Graaf R, Hyder F, Mason G, Behar K, De Feyter H, In vivo ¹³C and ¹H-[¹³C] MRS studies of neuroenergetics and neurotransmitter cycling, applications to neurological and psychiatric disease and brain cancer [Internet]. *NMR Biomed.* 2019; 32(10):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1002/nbm.4172>
 94. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 2006; 98(3):641–653.
 95. Rosst BD. Biochemical Considerations in ¹H Spectroscopy. Glutamate and Glutamine; Myo-inositol and Related Metabolites. *NMR Biomed.* 1991; 4:59–63.
 96. Cooper AJL, Jeitner TM. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules* 2016; 6(2)
 97. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016
 98. Häberle J. Clinical practice: The management of hyperammonemia. *Eur. J. Pediatr.* 2011; 170(1):21–34.
 99. Lu C, Malenka RC. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP / LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012; 1–15.
 100. Kurbat MN, Lelevich V V. Metabolism of amino acids in the brain. *Neurochem.*



J. 2009; 3(1):23–28.

101. Perlman JM, Volpe JJ. Amino Acids [Internet]. Sixth Edition. Elsevier Inc.; 2017. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42876-7.00027-2>



NMR-based metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signature of brain death

Martha E. García-Aguilera¹ · Eduardo Rodríguez de San Miguel² · Jocelyn Cruz-Pérez³ · Lucinda Aguirre-Cruz³ · Christian M. Ramirez-Alfaro³ · Nuria Esturau-Escofet¹

Received: 8 February 2021 / Accepted: 11 April 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Introduction Brain death (BD) is the irreversible cessation of all functions of the entire brain, including the brainstem. Cerebrospinal fluid (CSF) is a biological liquid that circulates in brain and spine. Metabolomics is able to reveal the response of biological systems to diverse factors in a specific moment or condition. Therefore, the study of this neurological condition through metabolic profiling using high resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is important for understanding biochemical events.

Objectives The aim of the current study is to identify the metabolomics signature of BD using ¹H-NMR spectroscopy in human CSF.

Methods ¹H-NMR spectroscopy has been employed for metabolomic untargeted analysis in 46 CSF samples: 22 control and 24 with BD. Spectral data were further subjected to multivariate analysis.

Results Statistically significant multivariate models separated subject's samples with BD from controls and revealed twenty one discriminatory metabolites. The statistical analysis of control and BD subjects using Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) model resulted in R²X of 0.733 and Q² of 0.635. An elevation in the concentration of statistically discriminant metabolites in BD was observed.

Conclusion This study identifies a metabolic signature associated with BD and the most relevant enriched selected metabolic pathways.

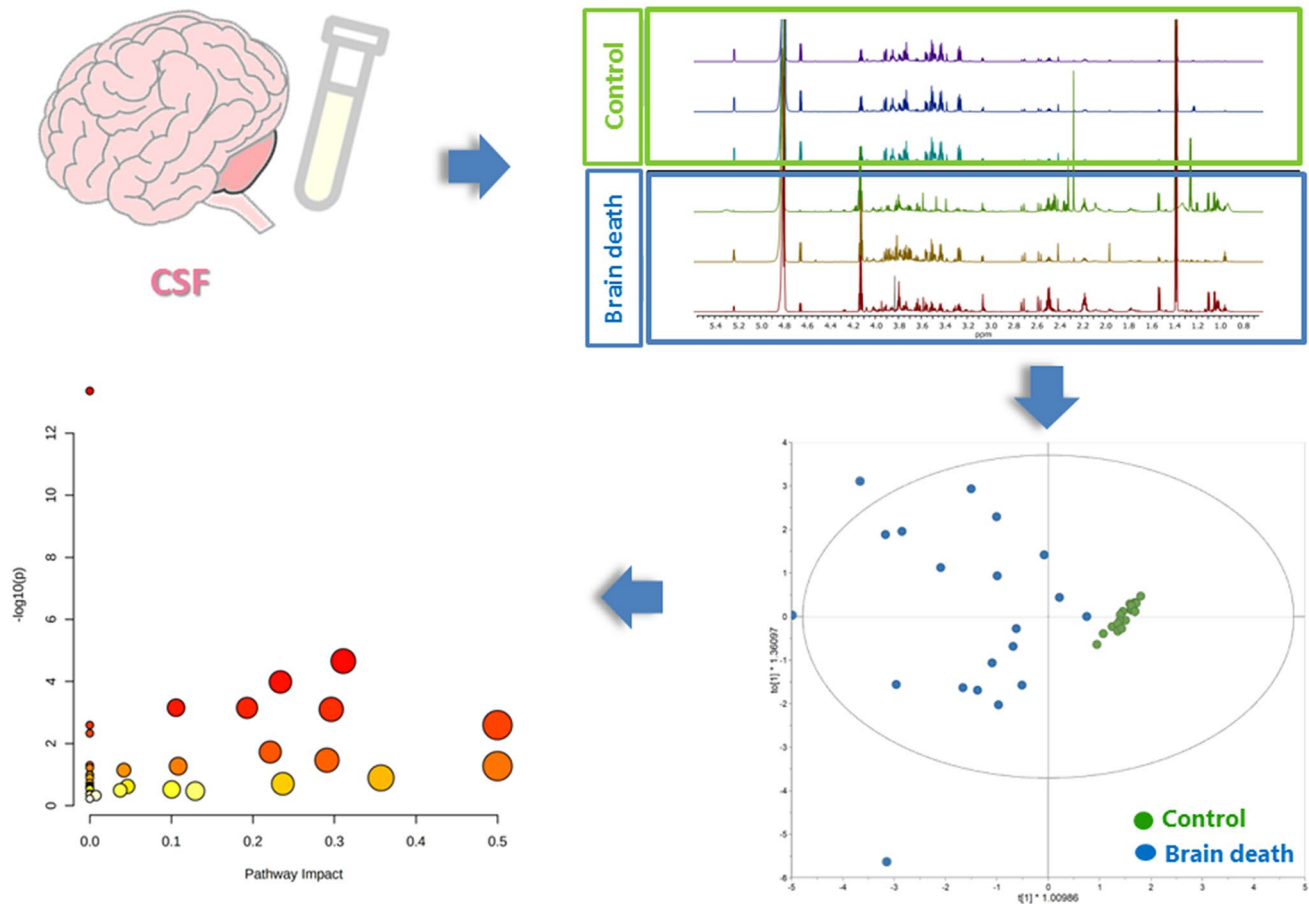
✉ Nuria Esturau-Escofet
nesturau@iquimica.unam.mx

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

² Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Cd. Mexico City, Mexico

³ Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico

Graphic Abstract



Keywords NMR metabolomics · Cerebrospinal fluid · Brain death · Metabolic profiling

1 Introduction

Brain death (BD) is defined by *The Uniform Determination of Death Act* as “the irreversible cessation of circulatory and respiratory functions, or irreversible cessation of all functions of the entire brain, including the brain stem” (National Conference of Commissioners on Uniform State Laws, 1980). In general, BD in adults is a consequence of anoxic brain damage, traumatic brain damage, subarachnoid bleeding, metabolic dysregulation or ischemic stroke (Nathan & Greer, 2006; Wijdicks et al., 2011). Those conditions cause diverse inflammatory, hormonal, metabolic and hemodynamic alterations (Barklin, 2009; Floerchinger et al., 2012; Spinello, 2015). Due to the complexity of the pathophysiology and legal implications, the process for BD certification includes confirmatory studies such as electroencephalography, transcranial doppler and angiography (Floerchinger et al., 2012). According to *The American Academy of Neurology* (AAN) the medical standards for the determination of

BD emphasized 3 clinical findings necessary to confirm it: coma (with a known cause), absence of brainstem reflexes, and apnea (“special article Practice parameters for determining brain death in adults”, 1996).

The pathophysiology of BD has been investigated extensively, as the understanding of biochemical events occurring in BD is critical for important reasons such as timely diagnosis to maximize the success of organ transplantation and to define the therapeutic pattern with a patient (Brasil et al., 2016; Güzel et al., 2014). The high-throughput in current technologies such as metabolomics provides more possibilities in the study of BD and allows better comprehension of the nervous system functions.

Metabolomics is able to reveal the response of biological systems to genetic, nutritional and environmental influence through the analysis of the metabolome in a specific moment or condition (Harker et al., 2006). The metabolome is the collection of low-molecular-weight compounds (including amino acids, lipids, organic acids, and nucleotides) products

or intermediates (endogenous or exogenous) of the chemical-enzymatic processes resulting from cellular metabolism in a tissue, organism, or biofluid such as serum, plasma, cerebrospinal fluid (CSF), and urine (Griffin, 2003; Nicholson et al., 1999; Ren et al., 2015; Weljie et al., 2006).

Cerebrospinal fluid (CSF) is a biological liquid that circulates in brain and spine, which protects the brain from changes in blood pressure and trauma. CSF is produced and circulates in the ventricles and the subarachnoid space of the brain and spinal column to transport, deliver, filter and/or remove nutrients, cellular products and neurotransmitters metabolites. The composition of CSF depends on metabolite's active transport from blood and secretion from the brain, therefore the CSF metabolome reflects the biochemical condition of the CNS. For this reasons CSF analysis is so important in biomedical research and clinical practice for diagnosis and monitoring the progression of neurological diseases (Mandal et al., 2012; Mochel, 2010; Romeo et al., 2005; Stoop et al., 2010).

In the last years, the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy in metabolomics has increased substantially because there have been substantial developments to enhance its sensitivity such as the use of cryogenically cooled probes. While other techniques are more sensitive compared to NMR, NMR is highly reproducible, a wide range of metabolites can be quantified simultaneously with minimal or no sample preparation or separation, it is non-destructive and the metabolite profile of a biological sample can be acquired in a short period of time (Ellinger et al., 2011; Emwas et al., 2013, 2018, 2019; Govindaraju et al., 2000; Griffin, 2003; Mussap et al., 2013; Nicholson et al., 1999; Ren et al., 2015; Rubtsov et al., 2007; Wishart, 2008; Zhang et al., 2016).

The study of diseases through metabolomics in CSF is becoming more common worldwide, for example it has been used in the description of the metabolic profile of patients with Alzheimer's disease (Cruz et al., 2014), multiple sclerosis (Cocco et al., 2016; Dickens et al., 2014; Kim et al., 2017; Reinke et al., 2014), moyamoya disease (Jeon et al., 2015), rabies (Condori et al., 2016; O'Sullivan et al., 2013), meningitis (Chatterji et al., 2016, 2017; Li et al., 2017), inflammatory diseases of the CNS (French et al., 2018), Parkinson's disease (Wu et al., 2016), lymphoma (Graça et al., 2017), Guillain Barré Syndrome (Park et al., 2019) and migraine (Zielman et al., 2016).

Most of the metabolomics' studies related to BD have focused on post-mortem interval due to its important in forensic investigations and in organ transplantation. It has been analyzed in animal models (Gonzalez-Riano et al., 2017; Mora-Ortiz et al., 2019) and in human tissues (Pesko et al., 2020; Romeo et al., 2005). Regarding the time since death, studies of CSF biochemical profile's (Arroyo et al., 2005; Girela et al., 2008; Swain et al., 2015; Takata et al.,

2014) and brain tissues (Ith et al., 2002) has been carried out.

To the best of our knowledge, there is no metabolomics ¹H-NMR-based study of BD in human CSF. The only one is a targeted analysis of Stefani et al., where they used HPLC to analyze four possible prognostic biomarkers of neurological outcome after severe head trauma: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), lactate, and glutamate. The analysis correlated the increase in lactate and glutamate with the prediction of BD within 3 days after the patient's admission to the hospital. In this study, 20 patients were monitored, of whom 6 died and 14 survived (Stefani et al., 2017).

Any study that contributes to the understanding of biochemical changes in the metabolic pathways involved in BD is very important: they could help in the diagnosis, monitoring disease progression and the efficacy of a treatment, as well as in the development of new therapeutic procedures and neuroprotective strategies. The aim of the current study is to identify the metabolomics signature of BD using ¹H-NMR spectroscopy in human CSF.

2 Materials and methods

2.1 Patient information

A cross-sectional study was carried out between 2017 and 2018 with patients of the National Institute of Neurology and Neurosurgery of Mexico. A total of 24 patients with BD (9 stroke; 10 brain tumors, 2 spontaneous cranial hemorrhage, 1 cerebral venous thrombosis, 1 cerebral edema and 1 super-refractory status epilepticus) and 22 control patients (7 cephalic subjects, 11 encephalitic subjects, 3 multiple sclerosis, 1 neuromyelitis optica) are included in this study. The inclusion criteria for BD group were clinical BD determined by AAN criteria (Wijdicks et al., 2011). The inclusion criteria for control group were alive subjects. The exclusion criteria for both groups were patients with an infection. The characteristics of BD patients are shown in Table 1. The control subjects were seven females and fifteen males, between 18 and 48 years (median 25.5 years). Informed consent for participating in this study was obtained from patient's family members and/or directly from individuals, according to the Declaration of Helsinki. At the moment when the consent form was applied, family members were also questioned about patient's lifestyle and preexistent diseases. The local institutional Ethics Committee approved this protocol (project number 68/17 and 60/18).

Table 1 Demographic data and clinical characteristics of BD subjects

Variables	BD (n=20)
Age, years (median, \pm range)	41 (19–61)
Sex, (female/male)	15/9
MAP (mmHg)	115 \pm 25/69 \pm 15
PO ₂ (mmHg)	95 \pm 28
PCO ₂ (mmHg)	36 \pm 7
Comorbidities	
Group I (DM and/or HTA)	8
Group II (Brain tumors)	8
Group III (Autoimmune disorders)	1
Group IV (Without pathological background)	2
Group V (Toxicomanias)	2
Group VI (Epilepsy)	3
Stated time of death	1–3 h

2.2 Sample collection

One mL of CSF was collected from BD subjects during ventricular drain or by lumbar puncture, and from control subjects by conventional lumbar puncture as part of routine clinical examination. The CSF samples were transported to the lab at 4 °C and centrifuged at 3000 \times g in an Eppendorf centrifuge during 10 min at the same temperature to obtain cell-free supernatants and stored at – 70 °C until NMR analysis to preserve sample stability.

2.3 Sample preparation

NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ and deuterium oxide (D₂O) (D, 99.98%) were purchased from by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trimethylsilyl propionic acid-d₄ sodium salt (TSP) was supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

CSF samples were thawed at room temperature. Once thawed, samples were deproteinized using a 10 kDa filter (Sartorius). Prior to use, filters had been washed 3 times with water and then D₂O to remove the glycerol contained in the ultrafiltration membranes. 400 μ l of ultrafiltered CSF was mixed with 200 μ l of 153.1 mM sodium phosphate buffer prepared in D₂O (pD 7.4) with TSP 0.25 mM (providing a chemical shift reference 0.00 ppm). Mixed samples were transferred to a 5-mm NMR tube.

2.4 NMR analysis

All ¹H-NMR spectra of CSF were collected at 298 K on an Avance III HD spectrometer operating at a ¹H frequency of 699.95 MHz, 16.4 T (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped

with a 5-mm z-axis gradient TCI cryoprobe and SampleJet automatic sample changer.

¹H-NMR spectrum was recorded using the standard one-dimensional pulse sequence using the first increment of the NOESY pulse sequence (Bruker noesypr1d pulse sequence), in which the residual water frequency was irradiated during the relaxation delay of 4.0 s and during the mixing time of 10 ms. A total of 256 scans were collected into 72 k data points over a spectral width of 14 kHz with an acquisition time of 2.5 s. Free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function with a line-broadening factor of 0.3 Hz before Fourier transformation. The ¹H-NMR spectra were manually corrected for phase and base line distortion using Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx Inc, Edmonton, Canada) software. The ¹H-NMR chemical shifts were referenced to TSP signal at 0.0 ppm. Additionally, 2D-NMR experiments were performed on representative samples to confirm chemical shift assignments, including ¹H-¹H Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (HSQC), and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) using standard Bruker pulse programs.

2.5 Metabolite identification and quantification

Chenomx NMR Suite v. 8.4 software package was used to identify and quantify the metabolites present in the samples based on the location of individual resonances on the spectra. The confirmation of some metabolites assignment was carried out considering chemical shifts, coupling constants and multiplicity patterns of metabolites as reported in literature (Govindaraju et al., 2000; Maillet et al., 1998; Mandal et al., 2012) and in Human Metabolome Data Base (HMDB) (Wishart et al., 2008).

2.6 Data processing and statistical analysis

Considering the large amount of data obtained in an NMR spectrum and its multivariate nature, the extraction of important information becomes a continuing challenge. So it is important to perform multivariate data analysis (MVA) on the metabolic data set to compare patterns to find relevant features that distinguish between sample classes (Ellinger et al., 2011; Long, 2013; Wishart, 2008; Worley & Powers, 2012).

Before MVA, the spectra were preprocessed using the software Chenomx, each ¹H-NMR spectrum was subdivided into 0.02 ppm buckets from – 0.5 to 13.5 ppm. Processed spectra were normalized to the TSP signal area on 0.0 ppm. The residual signal of water was excluded (4.69–5.01 ppm).

The resulting normalized integrals composed the data matrix that was submitted to MVA in the SIMCA 16.0.1.7928 software (Umetrics, Sartorius Stedim Biotech)

using Pareto scaling method. Initially, we performed Principal Component Analysis (PCA), one of the most useful exploratory and unsupervised techniques to exclude outliers, and to identify the dominant variant in the dataset not associated with the biological effect. Subsequently, supervised techniques were used for identifying differences among groups, such as Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) which uses class memberships to maximize the discrimination between groups for a particular biological effect. Also, we applied another widely used supervised technique, Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) to remove systematic variation in X that is orthogonal to Y (Emwas et al., 2013; Eriksson et al., 2004; Holmes & Antti, 2002; Mussap et al., 2013; Nicholson et al., 1999; Ren et al., 2015; Weljie et al., 2006; Zhang et al., 2016). The quality of each model was determined by the goodness of fit parameter (R^2) and the goodness of prediction parameter and the fraction of the total variation predicted by a component (Q^2). The determination of the metabolites responsible for the separation between control and BD groups was done using the loadings plot and the variable importance in the projection (VIP) value of each bin in the model to identify biomarkers (O'Sullivan et al., 2013).

Univariate statistical analysis was carried out on MetaAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca) and Matlab version R2020b (The MathWorks Inc.) with the Permutation Test extension (<https://github.com/lrkrol/permutationTest>).

2.7 Pathway analysis

MetaboAnalyst 5.0 was used to identify the most relevant metabolic pathways that were significantly enriched in the metabolomic data. MetaboAnalyst 5.0, using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database (KEGG; www.genome.jp/kegg/). Hypergeometric test and relative betweenness centrality were assessed. Both results were simultaneously plotted to show the most significant pathways in terms of enrichment analysis and pathway topology analysis (Xia & Wishart, 2011, 2016; Xia et al., 2011).

3 Results and discussion

Typical 700 MHz ^1H NMR spectra and representative metabolites assignments of CSF from BD and control samples are shown in Fig. 1. The qualitative analysis of the spectra enabled the identification of 63 metabolites (not shown). The assigned metabolites comprised amino acids (e.g. histidine, lysine, alanine, glutamine, valine, leucine, proline and phenylalanine), other endogenous metabolites (e.g. lactate, 2-hydroxybutyrate, creatine and pyruvate), among others. An increase in the signals of

some metabolites like lactate, glutamine, alanine, leucine, creatine, phenylalanine and histidine was observed comparing the control with the BD spectra.

The 46 ^1H NMR spectra of the CSF samples were subjected to an unsupervised PCA, Hotelling's T2 and DModX test with a confidence level of 95% to look for clustering and remove extreme outliers (Fig S1 and Fig S2). The original BD group was slightly reduced by excluding 4 cases according to these analyses.

After removal of outliers, a new matrix was constructed with 22 controls and 20 BD samples, multivariate analysis was applied to assess grouping and to identify variations between control and BD. Firstly, PCA was used to explore and visualize variations and possible patterns in the dataset (Fig. 2a), and the resultant model had 5 principal components explaining 91.40% of spectral variation. PC1 was able to capture 54.2% of spectral variation and PC2 21.7%, while PC3, PC4 and PC5 explained less than 10% each one. All the control samples lie in close proximity, as shown in scores plot of the first two principal components. In contrast, strong dispersion was observed between data from BD samples.

Following PCA, supervised methods were employed to search for signatures associated with BD group. OPLS-DA was used to assess whether variation between both study groups directly correlated with the spectral variation observed in the PCA analysis. A 1 + 1 + 0 latent variable model was able to account for 73.3% of spectral variation (R^2X), 71.2% of group variation (R^2Y) and the goodness of the prediction was 63.5% (Q^2) (Fig. 2b). Loadings (Fig. 2c) and variable importance in projection (VIP) was considered to establish the bins responsible for the separation between control and BD groups, variables with low VIP scores ($\text{VIP} < 1.5$) (Table S1) were not considered (O'Sullivan et al., 2013). This means that the metabolites related to those signals made the difference between the groups, so those metabolites were quantified. The statistical significance of the difference in metabolite concentrations between both groups was further assessed using non-parametric univariate tests (permutation test, p -value < 0.05). Therefore, using the loadings and VIP together with univariate analysis, we select 21 significant metabolites responsible for the separation between control and BD groups (Table 2).

In total 36 metabolites were quantified, 31 of which are elevated in BD, including those significantly responsible for the separation between control and BD groups (Table S2 and Fig S3) For quantification, in accordance with literature and in our experience, the desproteinization step by ultrafiltration is very important. This is because TSP (internal standard) binds to the proteins in the sample, such as albumin, resulting in a broadened/reduced signal and leading to higher metabolite concentrations (Engelke et al., 2006; Wevers et al., 1995).

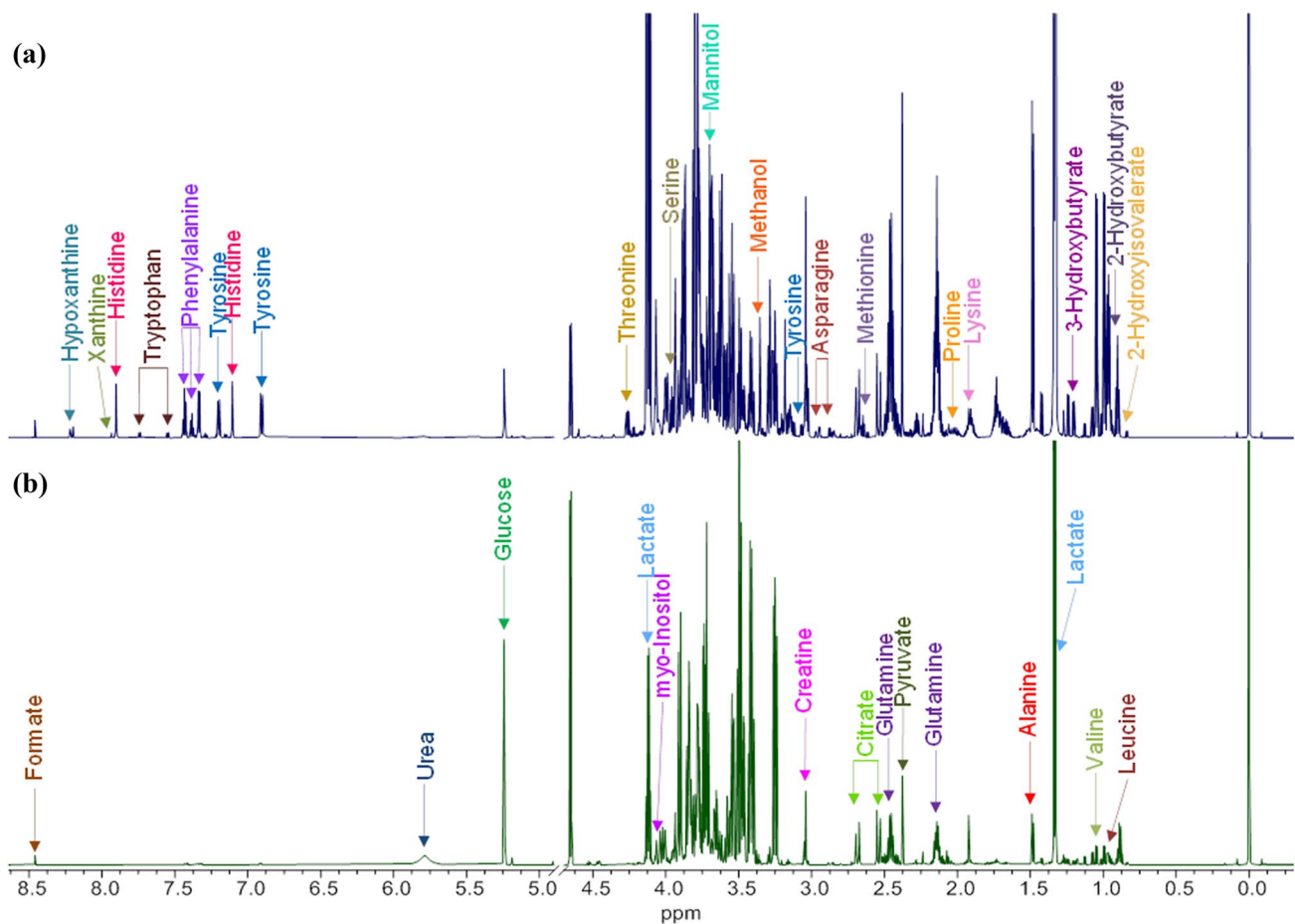


Fig. 1 Representative 700 MHz ^1H -NMR spectrum of CSF sample at pD 7.4 with some metabolites assignments, **a** BD and **b** control. The spectral region of water has been removed

Statistically significant multivariate models separated patients with BD from controls and revealed discriminatory metabolites. As expected from a previous publication (Stefani et al., 2017), BD patients showed significantly increased concentrations of lactate. In that study, Stefani et al., predict patients who will die within 3 days following severe traumatic brain injury (TBI) with the elevation of CSF glutamate and lactate levels. They explained that the impaired cerebrovascular pressure reactivity, and decreased brain perfusion and oxygenation, are driving metabolic abnormalities related to lactate. Also, they suggested that despite the presence of a satisfactory glucose supply, lactate production may significantly increase to attend brain metabolic needs. Considering the high extracellular availability of lactate, they proposed that neurons were apparently not capable of using lactate as substrate, contributing to the patient's death. Related to the glutamate increase, this might involve different factors associated to the tripartite glutamatergic synapse and could contribute to the deterioration of brain function after severe TBI, such as disrupted energy support, rapidly triggering neuronal death.

High lactate levels may be due to an impairment of mitochondrial function, reflecting decreased neuronal metabolism and it is typically interpreted as a marker of anaerobic glycolysis (Brodersen & Jorgensen, 1974; DeSalles et al., 1986). Increased lactate concentrations has been observed in other neurological diseases like rabies (Condori et al., 2016; O'Sullivan et al., 2013), bacterial meningitis (Chatterji et al., 2016), and neuromyelitis optica (Kim et al., 2017), among others.

The majority of the authors of clinical studies conclude that an increase in brain extracellular glutamate concentration is a signal of poor functional outcomes and neuronal and BD (Ankarcrone et al., 1995; Chamoun et al., 2011; Koura et al., 1998; Madeira et al., 2018). In addition to its excitatory function in CNS, glutamate stimulates glycolysis in astrocyte, glucose utilization and lactate production, which is shuttled to neurons (Pellerin & Magistretti, 1994).

In addition to Stefani et al., findings, our study detected high levels of glutamine in BD CSF samples (Stefani et al., 2017). The glutamine and glutamate NMR signals are in the

Fig. 2 **a** Scores of PCA of the NMR spectral data. **b** Scores of OPLS-DA of the NMR spectral data. Both models are from 22 controls (green) and 20 patients with BD (blue). **c** Loadings plot showing the NMR spectral regions responsible for the difference between the two groups with the identification of some key metabolites

same bins, so we establish both metabolites as responsible for the separation between groups.

Glutamate, the most abundant excitatory neurotransmitter of the human brain, is formed in the presynaptic neuron from glutamine by glutaminase and it is stored in synaptic vesicles. It is released at the synaptic cleft by the presynaptic neuron and it is taken up by the astrocytes via excitatory amino acids transporters (EAAT). The EAATs are sodium-dependent and they remove glutamate rapidly from the synaptic cleft to keep glutamate concentrations very low and prevent postsynaptic over-excitation, which might result in cell death.

Both, exogenous and endogenous (mainly generated from brain glutaminase, glutamate dehydrogenase and purine nucleotide enzyme cycle activity) brain ammonia, is used by astrocytes to convert the glutamate into glutamine by glutamine synthetase via amidation (Cooper & Lai, 1987; Cooper et al., 1985). There, 1 mol glutamine is synthesized using 1 mol glutamate, 1 mol ATP and 1 mol ammonia. Glutamine is rapidly discharged to the synaptic cleft from astrocytes by facilitated diffusion. Glutamine is transported to the presynaptic neuron where glutaminase catalyzes the formation of glutamate available for neurotransmission. In presynaptic neurons, ammonia is released from glutamine by phosphate-activated glutaminase. The enzymes glutamine synthetase and glutaminase take part in this cycle which operates between the presynaptic neuron, synaptic cleft and the astrocyte to maintain effective concentrations of both metabolites under normal physiological conditions. In spite of glutamate synthesized rapidly from glucose in neural tissue, the refilling process of the neurotransmitter after been released, involves the glutamine-glutamate cycle, a key mechanism for control of glutamatergic neurotransmission in the human brain (Lebon et al., 2002; Maciejewski & Rothman, 2008; Patel et al., 2005; Ramadan et al., 2013; Rothman et al., 2019).

Glutamine plays a vital role in cerebral function, in detoxification and regulation of neurotransmitter activities of its precursor. Also, it is well recognized the glutamine importance as a transport form of amino nitrogen (Bak et al., 2006; Rosst, 1990).

The increase of glutamine in our study revealed some alterations in the normal function of glutamine-glutamate cycle. One possible cause could be a metabolic disturbance called hyperammonemia. Hyperammonemia stimulates glutamine synthesis via glutamine synthetase, by possible inhibition of glutaminase and inhibition of glutamate

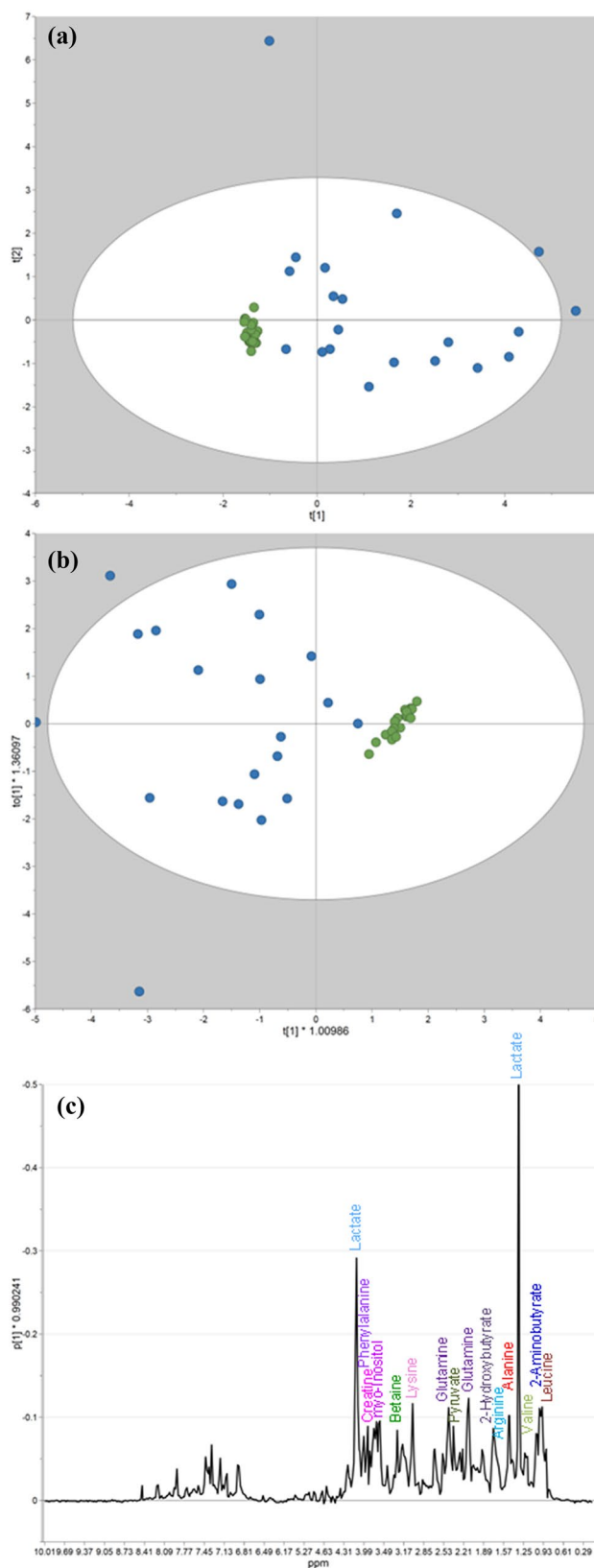


Table 2 Concentrations of the metabolites responsible for the separation between control and BD groups

Metabolite	Mean \pm SD (μ m)	
	Control	BD
Lactate	1405 \pm 152	6907 \pm 3230
Glutamate	4 \pm 2	37 \pm 104
Glutamine	399 \pm 98	1035 \pm 660
Creatine	39 \pm 6	125 \pm 103
Lysine	22 \pm 4	135 \pm 135
Leucine	11 \pm 4	157 \pm 181
Valine	15 \pm 6	200 \pm 209
Alanine	29 \pm 10	229 \pm 205
2-Aminobutyrate	3 \pm 1	16 \pm 13
myo-Inositol	113 \pm 30	217 \pm 187
Glycine	7 \pm 3	125 \pm 149
Glycerol	182 \pm 33	327 \pm 205
Pyruvate	71 \pm 28	241 \pm 77
Proline	3 \pm 2	65 \pm 83
3-Hydroxyisovalerate	4 \pm 2	7 \pm 4
2-Hydroxybutyrate	26 \pm 11	106 \pm 45
Arginine	17 \pm 10	42 \pm 28
Phenylalanine	7 \pm 1	87 \pm 84
Betaine	2 \pm 1	13 \pm 17
Asparagine	4 \pm 2	37 \pm 35
Histidine	10 \pm 4	79 \pm 90

The metabolites are shown in order of importance (VIP)

re-uptake by the astrocyte. An increase in the flux of calcium and sodium into postsynaptic neurons, is caused by a prolonged activation of ionotropic glutamate receptors. This increases the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) due to mitochondrial dysfunction, leading to cell damage or death. An over-excitation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptors induced excitotoxicity (neuronal damage). The excitotoxicity can be modulated by metabotropic glutamate receptors. Under hyperammonaemia, these receptors are inactivated (Cooper & Jeitner, 2016; Di Meo et al., 2016; Häberle, 2011; Lu & Malenka, 2012; “special article Practice parameters for determining brain death in adults”, 1996).

To identify biochemically meaningful patterns based on the metabolomics data in CSF, the significant metabolites responsible for the separation between control and BD groups were introduced into MetaboAnalyst 5.0 software. The altered metabolic pathways are shown in Fig. 3. Results showed that metabolites altered by BD belong to 35 biochemical pathways, 11 of them were identified as significantly enriched (p -value $<$ 0.05), among which 8 pathways had relatively large impact scores ($>$ 0.1) (Table S3). The most impacted pathways are mainly produced in brain and

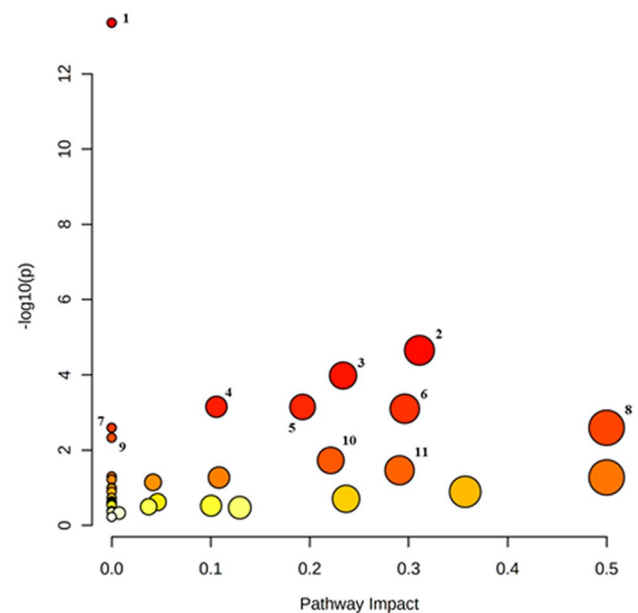


Fig. 3 Metabolic pathway analysis of the altered metabolic network identified between control and BD group. The x -axis represents the topology analysis (pathway impact) and the y -axis represents the enrichment analysis ($-\log(p)$). The following are the top 11 identified statistically significant pathways: 1: Aminoacyl-tRNA biosynthesis; 2: Alanine, aspartate and glutamate metabolism; 3: Arginine and proline metabolism; 4: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 5: Arginine biosynthesis; 6: Glycine, serine and threonine metabolism; 7: Nitrogen metabolism; 8: Glutamine and glutamate metabolism; 9: Valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 10: Histidine metabolism and 11: Pyruvate metabolism. The color and size of each pathway were set according to the p -values and pathway impact values, respectively

these are: glutamine and glutamate metabolism with 2 hits (glutamine and glutamate); alanine, aspartate and glutamate metabolism with 5 hits (asparagine, alanine, glutamate, glutamine and pyruvate); glycine, serine and threonine metabolism with 4 hits (betaine, glycine, creatine and pyruvate); pyruvate metabolism with 2 hits (lactate and pyruvate); arginine and proline metabolism with 5 hits (arginine, creatine, proline, glutamate and pyruvate); histidine metabolism with 2 hits (glutamate and histidine); arginine biosynthesis with 3 hits (glutamate, arginine and glutamine) and glyoxylate and dicarboxylate metabolism with 4 hits (glycine, glutamate, pyruvate and glutamine). Some other metabolic pathways listed in Table S3 have extracerebral origin due to the close interrelationship between the CSF and extracellular space of brain, and the dynamic flux with heart-beat, posture, and respiration. The relationship between choroid plexus and CSF, considered the third circulation, performs many functions including providing buoyancy, nourishment and endogenous waste product removal for the brain by bulk flow into the venous and lymphatic systems, and by carrier-mediated reabsorptive transport systems in choroid plexus. The CSF

also presents many exogenous compounds for metabolism or removal, indirectly cleansing the extracellular space of brain contributing to a stable internal milieu (Spector et al., 2015).

It is important to point out that the 3 principal metabolites responsible for the separation between control and BD groups (lactate, glutamine and glutamate) are involved in 7 of the most impacted pathways, except in the serine and threonine metabolism. This pathway includes the creatine, which is the fourth principal metabolite responsible for the separation.

4 Conclusion

Our study confirms the importance in the BD pathophysiology of lactate and glutamate, the two biomarkers used by Stefani et al., to predict BD after severe TBI. The increase in these two metabolites, and in glutamine, made the principal difference between groups. We also found other metabolites like, creatine, lysine, leucine, valine, alanine, 2-aminobutyrate, myo-inositol, glycine, glycerol, pyruvate, proline, 3-hydroxyisovalerate, 2-hydroxybutyrate, arginine, phenylalanine, betaine, asparagine and histidine as part of BD's signature. This study allows the identification of the most relevant metabolic pathways which were significantly enriched in the metabolomic data.

This approach identifies a metabolic signature associated with BD, and it also lays the foundations to build future models capable of predicting the patient outcome, or even to predict BD with the identification of diagnostic markers and prognosis. This technique can provide additional information on the confirmation of BD.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11306-021-01794-3>.

Acknowledgements This work is dedicated to the memory of our late coworkers Dra. Sandra Porcayo-Liborio and Dr. Rolando Antonio Arguedas Camacho. MEGA gratefully acknowledges CONACYT for the PhD scholarship 295848. This study was developed at LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACYT—Mexico (Project 0224747), and UNAM. The authors thank for the sample collection to the residents of INNyN Gonzalo Flores Chagolla, Francisco Bejarano Rodríguez, Emma Ortiz Islas, Elizabeth Mendoza Portillo, Fernando Jose Roosenberg Ordóñez and Julissa Abreu Ramirez.

Author contributions NEE and MLLA conceived the research. SPL, CMRA and JCP selected the subjects, supervised the patient's care and the sample collection. MEGA and NEE design and perform NMR analysis. MEGA, NEE and ERSM perform chemometric analysis. MEGA and NEE wrote the manuscript. All authors contributed with the data interpretation, read and approved the final manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval This study was reviewed and approved by the ethical committee of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (Approval Number: 68/17 and 60/18).

Informed consent CSF samples were collected for routine clinical procedures and analyzed retrospectively. Informed consent for participating in this study was obtained from patients' family members and directly from individuals.

Research involving human and animal rights All procedures performed directly from individuals were according to the ethical standards of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (Approval Number: 68/17 and 60/18) and performed in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

References

- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., & Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15(4), 961–973. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90186-8)
- Arroyo, A., Rosel, P., & Marron, T. (2005). Cerebrospinal fluid: Post-mortem biochemical study. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 12(3), 153–156. <https://doi.org/10.1016/j.jcfm.2004.11.001>
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>
- Barklin, A. (2009). Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 53(4), 425–435. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2008.01879.x>
- Brasil, S., Bor-Seng-Shu, E., de Lima-Oliveira, M., Azevedo, M. K., Teixeira, M. J., Bernardo, L., & Bernardo, W. M. (2016). Role of computed tomography angiography and perfusion tomography in diagnosing brain death: A systematic review. *Journal of Neuroradiology*, 43(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2015.07.006>
- Brodersen, P., & Jorgensen, E. O. (1974). Cerebral blood flow and oxygen uptake, and cerebrospinal fluid biochemistry in severe coma. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 37(4), 384–391. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.4.384>
- Chamoun, R., Suki, D., Gopinath, S. P., Goodman, J. C., & Robertson, C. (2011). Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.3171/2009.12.JNS09689>
- Chatterji, T., Singh, S., Sen, M., Singh, A. K., Agarwal, G. R., Singh, D. K., et al. (2017). Proton NMR metabolic profiling of CSF reveals distinct differentiation of meningitis from negative controls. *Clinica Chimica Acta*, 469, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.015>
- Chatterji, T., Singh, S., Sen, M., Singh, A. K., Maurya, P. K., Husain, N., et al. (2016). Comprehensive 1H NMR metabolic profiling of body fluids for differentiation of meningitis in adults. *Metabolomics*, 12(8), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1073-y>
- Cocco, E., Murgia, F., Loreface, L., Barberini, L., Poddighe, S., Frau, J., et al. (2016). 1H-NMR analysis provides A metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000185>
- Condori, R. E., David, D., Encarnacion, R., & Fatteh, N. (2016). Metabolomics of cerebrospinal fluid from humans treated for

- rabies. *Journal of Proteome Research*, 12(1), 481–490. <https://doi.org/10.1021/pr3009176>
- Cooper, A. J. L., & Jeitner, T. M. (2016). Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules*, 6(2), 2. <https://doi.org/10.3390/biom6020016>
- Cooper, A. J. L., & Lai, J. C. K. (1987). Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochemical Pathology*, 6(1–2), 67–95. <https://doi.org/10.1007/BF02833601>
- Cooper, A. J. L., Mora, S. N., Cruz, N. F., & Gelbard, A. S. (1985). Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. *Journal of Neurochemistry*, 44(6), 1716–1723. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb07159.x>
- Cruz, T., Balayssac, S., Gilard, V., Martino, R., Vincent, C., Pariente, J., & Malet-Martino, M. (2014). 1H NMR analysis of cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients: An example of a possible misinterpretation due to non-adjustment of pH. *Metabolites*, 4(1), 115–128. <https://doi.org/10.3390/metabo4010115>
- DeSalles, A. A. F., Kontos, H. A., Becker, D. P., Yang, M. S., Ward, J. D., Moulton, R., et al. (1986). Prognostic significance of ventricular CSF lactic acidosis in severe head injury. *Journal of Neurosurgery*, 65(5), 615–624. <https://doi.org/10.3171/jns.1986.65.5.0615>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dickens, A. M., Larkin, J. R., Griffin, J. L., Cavey, A., Matthews, L., Turner, M. R., et al. (2014). A type 2 biomarker separates relapsing-remitting from secondary progressive multiple sclerosis. *Neurology*, 83(17), 1492–1499. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000905>
- Ellinger, J. J., Chylla, R. A., Ulrich, E. L., & Markley, J. L. (2011). Databases and software for NMR-based metabolomics. *Bone*, 72(2), 132–135. <https://doi.org/10.2174/2213235x11301010028>
- Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., et al. (2019). Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, 9(7), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, 14(3), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>
- Emwas, A. H. M., Salek, R. M., Griffin, J. L., & Merzaban, J. (2013). NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, 9(5), 1048–1072. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0524-y>
- Engelke, U. F. H., Kremer, B., Kluijtmans, L. A. J., van der Graaf, M., Morava, E., Loupatty, F. J., et al. (2006). NMR spectroscopic studies on the late onset form of 3-methylglutaconic aciduria type I and other defects in leucine metabolism. *NMR in Biomedicine*, 19(2), 271–278. <https://doi.org/10.1002/nbm.1018>
- Eriksson, L., Antti, H., Gottfries, J., Holmes, E., Johansson, E., Lindgren, F., et al. (2004). Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabolomics (gpm). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 419–429. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2783-y>
- Floerchinger, B., Oberhuber, R., & Tullius, S. G. (2012). Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplantation Reviews*, 26(2), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2011.10.001>
- French, C. D., Willoughby, R. E., Pan, A., Wong, S. J., Foley, J. F., Wheat, L. J., et al. (2018). NMR metabolomics of cerebrospinal fluid differentiates inflammatory diseases of the central nervous system. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007045>
- Girela, E., Villanueva, E., Irigoyen, P., Girela, V., Hernández-Cueto, C., & Peinado, J. M. (2008). Free amino acid concentrations in vitreous humor and cerebrospinal fluid in relation to the cause of death and postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 53(3), 730–733. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00726.x>
- Gonzalez-Riano, C., Tapia-González, S., García, A., Muñoz, A., DeFelipe, J., & Barbas, C. (2017). Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Structure and Function*, 222(6), 2831–2853. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1375-5>
- Govindaraju, V., Young, K., & Maudsley, A. A. (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*, 13(3), 129–153. [https://doi.org/10.1002/1099-1492\(200005\)13:3%3c129::AID-NBM619%3e3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1099-1492(200005)13:3%3c129::AID-NBM619%3e3.0.CO;2-V)
- Graça, G., Desterro, J., Sousa, J., Fonseca, C., Silveira, M., Serpa, J., et al. (2017). Identification of putative biomarkers for leptomeningeal invasion in B-cell non-Hodgkin lymphoma by NMR metabolomics. *Metabolomics*, 13(11), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1269-9>
- Griffin, J. L. (2003). Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.008>
- Güzel, Y., Koç, Z. P., Mitil, H. A., Köm, M., Belin Özer, A., Ibrahim Özer, H., & Balci, T. A. (2014). Brain death scintigraphy and pathology results in a rat model. *Experimental and Clinical Transplantation*, 12(2), 143–147. <https://doi.org/10.6002/ect.2013.0026>
- Häberle, J. (2011). Clinical practice: The management of hyperammonemia. *European Journal of Pediatrics*, 170(1), 21–34. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1369-2>
- Harker, M., Coulson, H., Fairweather, I., Taylor, D., & Daykin, C. A. (2006). Study of metabolite composition of eccrine sweat from healthy male and female human subjects by 1H NMR spectroscopy. *Metabolomics*, 2(3), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0024-4>
- Holmes, E., & Antti, H. (2002). Chemometric contributions to the evolution of metabolomics: Mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *The Analyst*, 127(12), 1549–1557. <https://doi.org/10.1039/b208254n>
- Ith, M., Bigler, P., Scheurer, E., Kreis, R., Hofmann, L., Dirnhöfer, R., & Boesch, C. (2002). Observation and identification of metabolites emerging during postmortem decomposition of brain tissue by means of in situ 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(5), 915–920. <https://doi.org/10.1002/mrm.10294>
- Jeon, J. P., Yun, T., Jin, X., Cho, W. S., Son, Y. J., Bang, J. S., et al. (2015). 1H-NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid from adult bilateral moyamoya disease: Comparison with unilateral moyamoya disease and atherosclerotic stenosis. *Medicine (United States)*, 94(17), e629. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000629>
- Kim, H. H., Jeong, I. H., Hyun, J. S., Kong, B. S., Kim, H. J., & Park, S. J. (2017). Metabolomic profiling of CSF in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder by nuclear magnetic resonance. *PLoS ONE*, 12(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181758>
- Koura, S. S., Doppenberg, E. M. R., Marmarou, A., Choi, S., Young, H. F., & Bullock, R. (1998). Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. *Acta Neurochirurgica, Supplement*, 1998(SUPPL. 71), 244–246. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6475-4_70
- Lebon, V., Petersen, K. F., Cline, G. W., Shen, J., Mason, G. F., Dufour, S., et al. (2002). Astroglial contribution to brain energy

- metabolism in humans revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: Elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *Journal of Neuroscience*, 22(5), 1523–1531. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-05-01523.2002>
- Li, Z., Du, B., Zheng, X., Jia, H., Xing, A., Sun, Q., et al. (2017). Cerebrospinal fluid metabolomic profiling in tuberculous and viral meningitis: Screening potential markers for differential diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 466, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.002>
- Long, F. H. (2013). Multivariate analysis for metabolomics and proteomics data. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394446-7.00019-4>
- Lu, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Maciejewski, P. K., & Rothman, D. L. (2008). Proposed cycles for functional glutamate trafficking in synaptic neurotransmission. *Neurochemistry International*, 52(4–5), 809–825. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.09.015>
- Madeira, C., Vargas-Lopes, C., Otávio Brandão, C., Reis, T., Laks, J., Panizzutti, R., & Ferreira, S. T. (2018). Elevated glutamate and glutamine levels in the cerebrospinal fluid of patients with probable Alzheimer's disease and depression. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00561>
- Maillet, S., Vion-Dury, J., Confort-Gouny, S., Nicoli, F., Lutz, N. W., Viout, P., & Cozzone, P. J. (1998). Experimental protocol for clinical analysis of cerebrospinal fluid by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *Brain Research Protocols*, 3(2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00033-6)
- Mandal, R., Guo, A. C., Chaudhary, K. K., Liu, P., Yallou, F. S., Dong, E., et al. (2012). Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: A comprehensive and quantitative update. *Genome Medicine*, 4(4), 1–11. <https://doi.org/10.1186/gm337>
- Mochel, F. (2010). Nuclear magnetic resonance of cerebrospinal fluid: The neurometabolome. *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511996634.016>
- Mora-Ortiz, M., Trichard, M., Oregioni, A., & Claus, S. P. (2019). Thanatometabolomics: Introducing NMR-based metabolomics to identify metabolic biomarkers of the time of death. *Metabolomics*, 15(3), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1498-1>
- Mussap, M., Antonucci, R., Noto, A., & Fanos, V. (2013). The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, 426, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.08.020>
- Nathan, S., & Greer, D. M. (2006). Brain death. *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, 25(4), 225–231. <https://doi.org/10.1053/j.sane.2006.09.005>
- National Conference of Commissioners on Uniform State Laws. (1980). Uniform Determination of Death Act - Model Statute, 8(5), pp. 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502147>
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- O'Sullivan, A., Willoughby, R. E., Mishchuk, D., Alcarraz, B., Cabezas-Sanchez, C., Condori, R. E., et al. (2013). Metabolomics of cerebrospinal fluid from humans treated for rabies. *Journal of Proteome Research*, 12(1), 481–490. <https://doi.org/10.1021/pr3009176>
- Park, S. J., Kim, J. K., Kim, H. H., Yoon, B. A., Ji, D. Y., Lee, C. W., et al. (2019). Integrative metabolomics reveals unique metabolic traits in Guillain-Barré Syndrome and its variants. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37572-w>
- Patel, A. B., De Graaf, R. A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Shulman, R. G., & Behar, K. L. (2005). The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5588–5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501703102>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10625–10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Pesko, B. K., Weidt, S., McLaughlin, M., Wescott, D. J., Torrance, H., Burgess, K., & Burchmore, R. (2020). Postmortomics: The potential of untargeted metabolomics to highlight markers for time since death. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 24(11), 649–659. <https://doi.org/10.1089/omi.2020.0084>
- Ramadan, S., Lin, A., & Stanwell, P. (2013). Glutamate and glutamine: A review of in vivo MRS in the human brain. *NMR in Biomedicine*, 26(12), 1630–1646. <https://doi.org/10.1002/nbm.3045>
- Reinke, S. N., Broadhurst, D. I., Sykes, B. D., Baker, G. B., Catz, I., Warren, K. G., & Power, C. (2014). Metabolomic profiling in multiple sclerosis: Insights into biomarkers and pathogenesis. *Multiple Sclerosis*, 20(10), 1396–1400. <https://doi.org/10.1177/1352458513516528>
- Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., & Lu, L. J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 11(6), 1492–1513. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0823-6>
- Romeo, M. J., Espina, V., Lowenthal, M., Espina, B. H., Petricoin, E. F., & Liotta, L. A. (2005). CSF proteome: A protein repository for potential biomarker identification. *Expert Review of Proteomics*, 2(1), 57–70. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.1.57>
- Rosst, B. D. (1990). Biochemical considerations in ^1H spectroscopy. Glutamate and glutamine; myo-inositol and related metabolites. *NMR in Biomedicine*, 4, 59–63. <https://doi.org/10.1002/nbm.1940040205>
- Rothman, D. L., de Graaf, R. A., Hyder, F., Mason, G. F., Behar, K. L., & De Feyter, H. M. (2019). In vivo ^{13}C and ^1H - ^{13}C MRS studies of neuroenergetics and neurotransmitter cycling, applications to neurological and psychiatric disease and brain cancer. *NMR in Biomedicine*, 32(10), 1–21. <https://doi.org/10.1002/nbm.4172>
- Rubtsov, D. V., Jenkins, H., Ludwig, C., Easton, J., Viant, M. R., Günther, U., et al. (2007). Proposed reporting requirements for the description of NMR-based metabolomics experiments. *Metabolomics*, 3(3), 223–229. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0040-4> (1996). special article Practice parameters for determining brain death in adults, pp. 1012–1014
- Spector, R., Robert Snodgrass, S., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 273, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>
- Spinello, I. M. (2015). Brain death determination. *Journal of Intensive Care Medicine*, 30(6), 326–337. <https://doi.org/10.1177/0885066613511053>
- Stefani, M. A., Modkovski, R., Hansel, G., Zimmer, E. R., Kopczynski, A., Muller, A. P., et al. (2017). Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(6), 392–402. <https://doi.org/10.1002/acn3.416>
- Stoop, M. P., Coulier, L., Rosenling, T., Shi, S., Smolinska, A. M., Buydens, L., et al. (2010). Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples.

- Molecular and Cellular Proteomics*, 9(9), 2063–2075. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000877>
- Swain, R., Kumar, A., Sahoo, J., Lakshmy, R., Gupta, S. K., Bhardwaj, D. N., & Pandey, R. M. (2015). Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 36, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.jffm.2015.09.017>
- Takata, T., Kitao, T., & Miyaiishi, S. (2014). Relationship between post-mortem interval and creatine concentration in vitreous humour and cerebrospinal fluid. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 46(2), 160–165. <https://doi.org/10.1080/00450618.2013.824027>
- Weljie, A. M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., & Slupsky, C. M. (2006). Targeted profiling: Quantitative analysis of ¹H NMR metabolomics data. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4430–4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>
- Wevers, R. A., Engelke, U., Wendel, U., De Jong, J. G. N., Gabreels, F. J. M., & Heerschap, A. (1995). Standardized method for high-resolution ¹H-NMR of cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry*, 41(5), 744–751. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.5.744>
- Wijdicks, E. F. M., Varelas, P. N., Gronseth, G. S., & Greer, D. M. (2011). Evidence-based guideline update: Determining brain death in adults: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 76(3), 1911–1918. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e242a8>
- Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001>
- Wishart, D. S., Lewis, M. J., Morrissey, J. A., Flegel, M. D., Jerončić, K., Xiong, Y., et al. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.001>
- Worley, B., & Powers, R. (2012). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235x130108>
- Wu, J., Wuolikainen, A., Trupp, M., Jonsson, P., Marklund, S. L., Andersen, P. M., et al. (2016). NMR analysis of the CSF and plasma metabolome of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Metabolomics*, 12(6), 101. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1041-6>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, 6(6), 743–760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Xia, J., Wishart, D. S., & Valencia, A. (2011). MetPA: A web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics*, 27(13), 2342–2344. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq418>
- Zhang, S., Gowda, G. A. N., Ye, T., & Raftery, D. (2016). Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1039/c000091d>
- Zielman, R., Postma, R., Verhoeven, A., Bakels, F., Van Oosterhout, W. P. J., Meissner, A., et al. (2016). Metabolomic changes in CSF of migraine patients measured with ¹H-NMR spectroscopy. *Molecular BioSystems*, 12(12), 3674–3682. <https://doi.org/10.1039/c6mb00424e>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.