



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis del N-óxido de trimetilamina (TMAO) por espectrometría de masas en suero de sujetos con síndrome metabólico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
L.N DIANA ITZEL VALERIO CORONEL

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Nimbe Torres y Torres
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. María Viridiana Olin Sandoval
Cinvestav-Zacatenco
Dra. Myrian Velasco Torres
IFC-UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2023



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.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a la **Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP)** de la UNAM por la beca aportada para realizar mis estudios de maestría.

Abreviaturas

AIF	Análisis por inyección en flujo
ATP III	Guía para el tratamiento en adultos III
Ca²⁺	Ion calcio
CG	Cortina de gas
CDG	Cromatografía de gases
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Da	Dalton
EC	Electroforesis capilar
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDC	Energía de colisión
FMO3	Flavina monooxigenasa 3
gProt/kg de peso	Gramos de proteína por kilogramos de peso
GS1	Gas nebulizador
GS2	Gas de secado
HDL-C	Colesterol de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia/rendimiento
ICAM-1	Molécula de adhesión endotelial
IE	Ionización por electrospray
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol-1, 4, 5-trifosfato
IS	ionspray
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LDL	Low Density Lipoprotein/Lipoproteína de baja densidad
MALDI	Desorción-ionización laser asistida por matriz

MS	Espectrometría de masas
M/Z	Relación masa/carga
NF-Kb	Factor nuclear-kB
PSCC	Potencial de salida de la celda de colisión
PD	Potencial de declostering
PE	Potencial de entrada
Q0	Cuadrupolo 0
Q1	Cuadrupolo 1
Q2	Cuadrupolo 2
Q3	Cuadrupolo 3
RMN	Resonancia magnética nuclear
SM	Síndrome metabólico
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido de trimetilamina
ToF	Tiempo de vuelo
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia/rendimiento

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas.....	3
Tabla de contenido.....	5
Índice de tablas.....	7
Índice de figuras.....	8
1. Resumen.....	10
2. Introducción.....	11
2.1 Metabolómica.....	11
2.2 Metabolómica dirigida y no dirigida.....	14
2.3 Metabolitos.....	18
2.4 N-óxido de trimetilamina (TMAO).....	18
2.5 TMAO y síndrome metabólico.....	20
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos particulares.....	21
6. Metodología.....	22
6.1 Muestra del estudio.....	22
6.2 Optimización de parámetros para la separación y cuantificación de TMAO por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	25
6.3 Extracción del metabolito de muestras de suero.....	26
6.4 Cuantificación de TMAO.....	27
6.5 Cuantificación de niveles de C-HDL, C-LDL, TG y glucosa.....	28
6.6 Análisis de resultados.....	28
7. Resultados.....	29
7.1 Optimización del método de cuantificación de TMAO por LC-MS/MS.....	29
7.2 Niveles de N-Óxido de trimetilamina en sujetos con síndrome metabólico.....	31
7.3 Cambios en los niveles de N-óxido de trimetilamina después de una intervención dietaria.....	40
8. Discusión.....	43
9. Conclusiones.....	47

10. Referencias.....47

Índice de Tablas

Tabla 1: Criterios de inclusión y exclusión.....	24
Tabla 2: Composición del plan de alimentación.....	25
Tabla 3: Condiciones para la obtención de los parámetros de fragmentación del TMAO.....	29
Tabla 4: Parámetros de la fuente de ionización.....	29
Tabla 5: Concentraciones de parámetros bioquímicos, concentraciones de TMAO y edad de 7 sujetos con síndrome metabólico y TMAO elevado.....	32
Tabla 6: Concentraciones de TMAO, cantidad de proteína animal, proteína vegetal y grProt/kg de peso corporal consumidos de forma habitual y un día antes de la toma de muestra de 7 sujetos con SM y TMAO elevado.....	34
Tabla 7: Alimentos precursores de TMA y TMAO consumidos frecuentemente por 7 sujetos con síndrome metabólico y concentraciones de TMAO elevado.....	36
Tabla 8: Concentraciones de TMAO en suero y grProt/kg de peso consumidos 24 horas antes de la toma de muestra antes y después de una intervención dietaria en 7 sujetos con síndrome metabólico y concentraciones iniciales de TMAO elevadas.....	43

Índice de Figuras

Figura 1: Componentes básicos de un espectrómetro de masas cuadrupolo.....	12
Figura 2: Mecanismo de ionización por electrospray.....	13
Figura 3: Sistema de cuadrupolo en tándem, triple cuadrupolo o MS/MS.....	14
Figura 4: Flujo de trabajo para un experimento de metabolómica dirigida de LC-MS de triple cuadrupolo.....	15
Figura 5: Parámetros a optimizar en la fuente de ionización por electrospray y espectrómetro de masas.....	17
Figura 6: Vías para la formación de N-óxido de trimetilamina (TMAO).....	20
Figura 7: Proceso de extracción del metaboloma de muestras de suero y su inyección a LC-MS/MS.....	27
Figura 8: Cromatograma de las transiciones utilizadas para la detección y cuantificación del estándar de TMAO.....	30
Figura 9: Concentraciones de TMAO en sujetos con síndrome metabólico.....	31
Figura 10: Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 64 sujetos con síndrome metabólico utilizando R software.....	33
Figura 11: Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 7 sujetos con síndrome metabólico y TMAO elevado utilizando R software.....	35
Figura 12: Concentración de colina, L-carnitina, betaina y ergotioneina (mg) en alimentos.....	37
Figura 13: Concentraciones de TMAO en sujetos con síndrome metabólico por sexo.....	38
Figura 14: Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 47 mujeres con síndrome metabólico utilizando R software.....	39
Figura 15: Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 17 hombres con síndrome metabólico utilizando R software.....	40

Figura 16: Cambios en las concentraciones de TMAO en 47 mujeres y 17 hombres con síndrome metabólico después de una intervención dietaria con alimentos funcionales41

Figura 17: Cambio en las concentraciones de TMAO de 7 sujetos con síndrome metabólico que presentaban concentraciones altas de TMAO al inicio de la intervención dietaria.....42

I. RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anomalías metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes. Para su definición y diagnóstico se utilizó la definición y criterios de diagnóstico propuestos por el National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III). Dado que el SM es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes, donde se ha observado la presencia de concentraciones elevadas del metabolito N-óxido de trimetilamina (TMAO), el objetivo del presente estudio fue identificar los niveles de TMAO en sujetos con SM e identificar su relación con algunos alimentos. Se utilizaron 128 muestras de suero sanguíneo de 64 sujetos con SM que anteriormente habían participado en un ensayo clínico pragmático en donde se llevó a cabo una intervención dietaria con una combinación de alimentos funcionales conocida como portafolio y que estaba compuesto de una mezcla de nopal deshidratado, semilla de chia, avena, proteína de soya, edulcorante surculosa e inulina en polvo. La intervención tuvo una duración de 2 meses durante las cuales los sujetos consumieron 1 sobre con 30 g del portafolio disuelto en 250 ml de agua por la mañana y otro por la noche.

Se observó que las concentraciones de TMAO en suero se encontraban en el rango de 0.6879 – 21.040 μM . Interesantemente, 7 sujetos con SM presentaron concentraciones arriba de 6.9 – 21 μM debido a que estos sujetos reportaron en un cuestionario de consumo de frecuencia de alimentos que consumían con mayor frecuencia ciertos alimentos que promovían la síntesis de TMAO. Por lo que el presente estudio mostró que el uso de metabolómica dirigida permite la identificación y cuantificación de TMAO con mayor precisión. La intervención dietaria con un portafolio a base de alimentos funcionales evita que las concentraciones de TMAO aumenten en los sujetos con síndrome metabólico. Por último, se encontró que el consumo de proteína animal se asociaba con concentraciones más altas de TMAO.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Metabolómica

A principios de la década de los noventa, la metabolómica empezó a emerger con gran fuerza, y se define como el estudio a grande escala de pequeñas moléculas conocidas como metabolitos. Colectivamente, estas pequeñas moléculas y sus interacciones dentro de un sistema biológico son conocidas como metaboloma, en el que se pueden identificar pequeñas moléculas dentro de una célula, tejido u organismo y biofluidos como la orina o el sudor (Roberts, Souza & Gerszten, 2012).

Para identificar los diferentes metabolitos se emplean técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), siendo esta última la más empleada en la metabolómica debido a su menor costo en comparación con la RMN y también a que esta técnica puede apoyarse con otras técnicas de separación como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC), cromatografía de gases (CG) o la electroforesis capilar (EC), las cuales permiten seleccionar o separar las moléculas de una muestra (Putri, Yamamoto, Tsugawa & Fukusaki, 2012) (Alonso, Marsal & Julià, 2015) (Klassen y otros, 2017).

La espectrometría de masas es una técnica analítica de la cual se obtienen datos espectrales en forma de una relación masa-carga (m/z) y una intensidad relativa de los compuestos medidos. Los datos espectrales se presentan en términos de Daltons (Da) por unidad de carga y son representados en el eje Y de una gráfica de dos dimensiones de abundancia de iones frente a la m/z (eje x). Para generar los dos ejes Y y X de la gráfica de abundancia es necesario conocer el tiempo de retención del metabolito a analizar, el cual es el tiempo que tarda en pasar el metabolito de interés a través de la columna del cromatógrafo, y que en conjunto con los valores m/z se pueden formar estos ejes de los datos espectrales. Toda la información proporcionada por un espectrómetro de masas proviene del análisis de iones en fase gaseosa por lo que para que esto se lleve a cabo la muestra biológica debe ser ionizada previamente.

Los espectrómetros de masas tienen tres componentes principales; 1) la fuente de ionización, 2) el analizador de masas y 3) el detector (Glish & Vachet, 2003). Figura 1

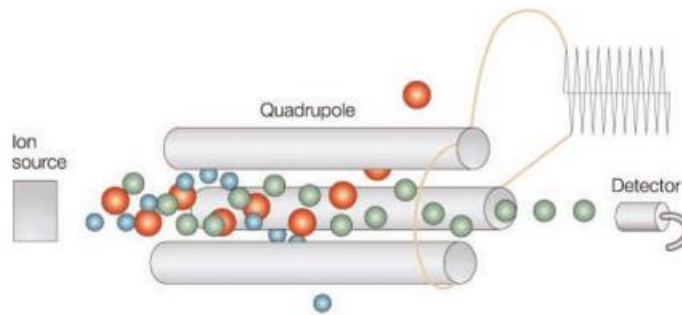


Figura 1. Componentes básicos de un espectrómetro de masas cuadrupolo. *Nota.* Tomado de The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, por Glish, G. & Vachet, R., 2003, Nature reviews. Drug Discovery, 2(2), 140-150.

1. **La fuente de ionización** es importante ya que es donde el analito de interés pasa a ser un ion en fase gaseosa. La ionización por electrospray (IES) se emplea con mayor frecuencia en la espectrometría de masas acoplado a HPLC ya que la IES permite el acoplamiento a técnicas de separación líquida permitiendo un análisis rápido y de alta sensibilidad (Putri, Yamamoto, Tsugawa & Fukusaki, 2012) (Glish & Vachet, 2003). La ionización por electrospray requiere de energía eléctrica que ayude con la transferencia de iones de una solución a una fase gaseosa antes de que este sea analizado por el espectrómetro con alta sensibilidad. La formación de iones a través de IES implica tres pasos; el primero es la nebulización de una solución de muestra en pequeñas gotas con carga eléctrica, el segundo es la evaporación del solvente para liberar a los iones de las gotas y el tercero es la expulsión o transporte de los iones desde la fuente de ionización hacia el analizador de masas del espectrómetro Figura 2 (Bruins, 1998).

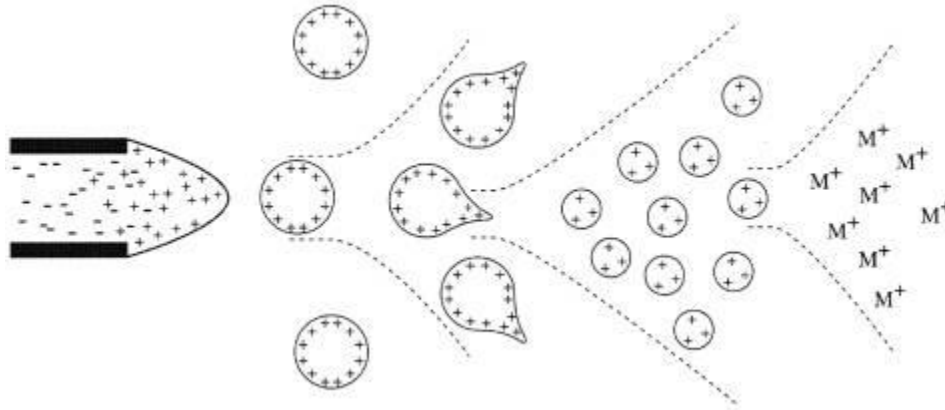


Figura 2. Mecanismo de ionización por electrospray. *Nota.* Tomado de “Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and clinical Applications (p.4), por CS, Ho, 2003, *Clin Biochem Rev*, (24)1 (Ho y otros, 2003).

2. **El analizador de masas** está constituido por el cuadrupolo el cual consiste en un conjunto de cuatro varillas metálicas que se encuentran en posición paralela, a la misma distancia y que se conectan eléctricamente, lo cual forma un campo eléctrico generando que los iones se desplacen con un movimiento oscilatorio hacia el detector. Esta oscilación con la cual se desplaza el ion tiene una amplitud que va a estar relacionada con la m/z y que puede cambiar al ajustar el voltaje aplicado a las varillas del cuadrupolo para permitir que los iones de interés viajen hasta el detector sin chocar con las varillas del cuadrupolo y que los que no son deseados y que tienen diferente m/z golpeen las varillas, se neutralicen y no lleguen al detector (Ho y otros, 2003). Algunos equipos de espectrometría de masas emplean un sistema de cuadrupolo en tándem también conocido como triple-quad o MS/MS. En este sistema hay tres cuadrupolos colocados en forma lineal y en cada uno se llevan a cabo distintas acciones, razón por la cual cada cuadrupolo contiene distinto voltaje. En este sistema de cuadrupolos cada uno es nombrado de diferente forma, el primero de ellos es el cuadrupolo 1 (Q1), seguido del cuadrupolo 2 (Q2) o celda de colisión y por último el cuadrupolo 3 (Q3). En el Q1, el ion de interés también llamado ion padre o precursor es seleccionado por su m/z debido a que este Q1 está configurado para que emita cierto voltaje y permita el paso del ion padre de interés. Este ion precursor pasa al Q2, lugar

donde sucede un proceso de disociación inducida por colisión en el cual el ion precursor colisiona o choca con un gas de colisión (nitrógeno u otro) generando así una fragmentación del ion precursor dando como resultado iones hijos, a esto se le conoce como transición y permite asegurar la identificación de un metabolito en especial cuando este se combina con un tiempo de retención cromatográfico conocido. Una vez que el ion precursor es fragmentado y se generan los iones hijos, estos iones son expulsados al Q3 en donde pueden ser analizados o bien si el Q3 se utiliza como un filtro al ajustar el voltaje que se emite en él entonces en este Q3 se selecciona una m/z de un fragmento hijo en particular para que este sea expulsado hacia el detector (Ho y otros, 2003) Figura 3. Algunos analizadores que utilizan un sistema triple-cuadrupolo también contienen una trampa de iones llamado cuadrupolo 0 o Q0, sin embargo, dependiendo lo que se quiera realizar este puede o no emplearse.

El detector se encarga de registrar el número de iones en cada valor de m/z , cuando estos golpean o pasan cerca de una superficie generándose así una señal que producirá un espectro de masa y que se verá reflejado en un cromatograma.

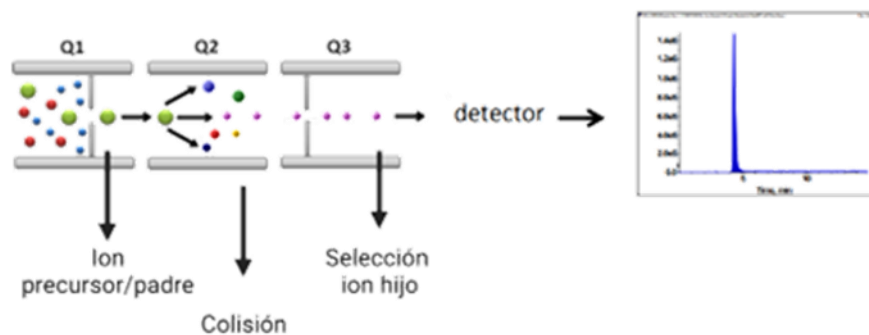


Figura 3. Sistema de cuadrupolo en tándem, triple-quad o MS/MS. *Nota.* Tomado de Development of an MRM Method (UAB Metabolomics - Metabolomics Workshop).

2.2 Metabolómica dirigida y no dirigida.

La metabolómica puede tener dos enfoques, el primer enfoque es la metabolómica no dirigida (untarget) la cual se caracteriza por realizar un análisis cualitativo del mayor número posible de metabolitos en una muestra incluyendo los desconocidos, el segundo

enfoque es la metabolómica dirigida el cual es un análisis cuantitativo o semicuantitativo de un grupo definido de metabolitos o bien de un solo metabolito que anteriormente hayan o haya sido caracterizado o identificado. A pesar de las diferencias que hay entre ambos enfoques, los dos coinciden en que su objeto de estudio es el mismo siendo este los metabolitos (Roberts, Souza & Gerszten, 2012).

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo o semicuantitativo de un metabolito en específico, el enfoque a elegir es un análisis dirigido debido a que en este al emplearse estándares internos, permite realizar un análisis cuantitativo. El proceso para realizar metabolómica dirigida utilizando un espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida es como se muestra en la figura 4 y se deben tomar en cuenta algunos puntos ya que estos pueden afectar la precisión del experimento y con ello los resultados, por ello antes de analizar las muestras es necesario optimizar el proceso para realizar metabolómica dirigida.

De forma general los pasos para realizar un análisis de metabolómica dirigida son: 1) la extracción del metabolito de la muestra, 2) la separación del metabolito por cromatografía, 3) la detección del metabolito por espectrometría de masas y 4) el análisis de datos.

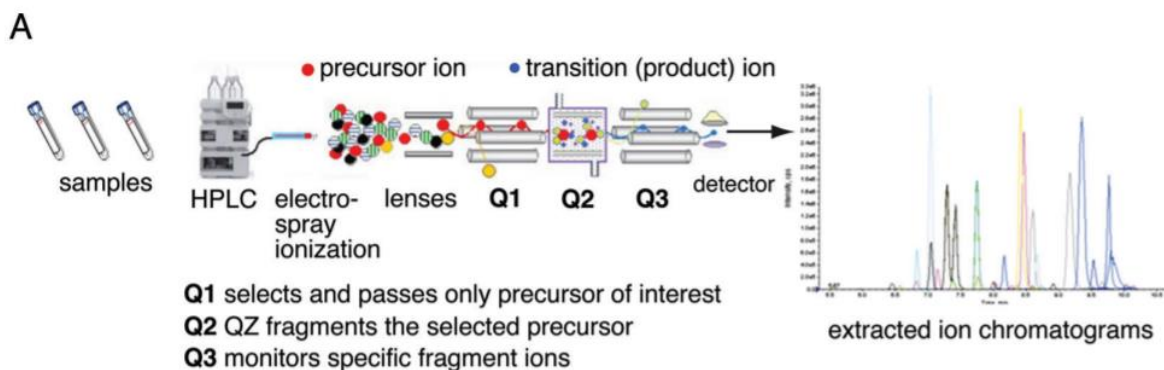


Figura 4. Flujo de trabajo para un experimento de metabolómica dirigida de LC-MS de triple cuadrupolo. *Nota.* Tomado de “Targeted Metabolomics” (Sup. 99, 30.2.4), por L., Roberts, 2012, *Current Protocols in Molecular Biology*, 30.2.1 (Roberts L. , Souza, Gerszten & Clish, 2012)

En el primer paso de la extracción del metabolito de interés de una muestra, se añade alcohol para reducir y/o eliminar moléculas como proteínas que estén presentes en la muestra y que pudiesen interferir en el análisis. Una vez que se llevó a cabo la extracción del metabolito, se procede a la optimización de los parámetros o condiciones en las que se debe realizar la cromatografía líquida (UHPLC) como lo es el flujo de los solventes de la fase móvil (concentración A y concentración B), el tiempo en que cada uno estará presente y la concentración a usar de cada uno. Por otro lado, también es importante la selección del tipo de columna (fase estacionaria) y los solventes que se ocuparan con el fin de separar el metabolito de interés ya que este al tener ciertas propiedades químicas requiere de cierto tiempo para pasar a través de la columna. Posterior a esto se realiza la optimización de los parámetros o condiciones en las cuales debe estar tanto la fuente de ionización como el espectrómetro de masas para poder ionizar e identificar al metabolito. Por un lado en la fuente de ionización que puede ser de tipo ionización por electrospray (IE), los parámetros a optimizar son el gas nebulizador (GS1) el cual sirve para formar pequeñas gotas que se desolvatan en la fuente de iones, el gas de secado (GS2) que ayuda a evaporar las gotas formadas para ionizar el compuesto, el voltaje ionspray (IS) aplicado en la punta de la aguja del ionspray para ionizar la muestra, la temperatura fuente que ayuda a evaporar las gotas y la cortina de gas (CDG) cuya función es la de desazolvar. Con respecto al espectrómetro de masas, los parámetros a optimizar son cuatro y hacen referencia a los voltajes que se aplican en este equipo, el primero de ellos es el potencial de declustering (PD) el cual es un voltaje aplicado para romper clúster/agrupaciones de iones que pudiesen formarse en el paso de la fuente de ionización al Q0, el segundo parámetro es el potencial de entrada (PE) que hace referencia a el potencial que se relaciona con la velocidad a la que entran los iones al Q1 que vienen del Q0, este PE puede servir para eliminar iones no deseados al aplicar un mayor EP provocando que los iones choquen contra el Q1 y no entren. El tercer parámetro es la energía de colisión (EDC) que se refiere a la tasa de aceleración a la cual los iones entran en el Q2 para así chocar con el gas de colisión y fragmentarse, el último parámetro es el potencial de salida de la celda de colisión (PSCC) que es la velocidad a la cual los iones deben salir del Q2 hacia el Q3 (UAB Metabolomics - Metabolomics Workshop) como se muestra en la figura 5. Cuando se realiza un análisis

dirigido algunos de estos parámetros se pueden consultar en diversos estudios para tomarse como base dado que el compuesto ya ha sido estudiado anteriormente, sin embargo, es de importancia optimizarlos ya que estos pueden variar dependiendo el equipo que se emplee.

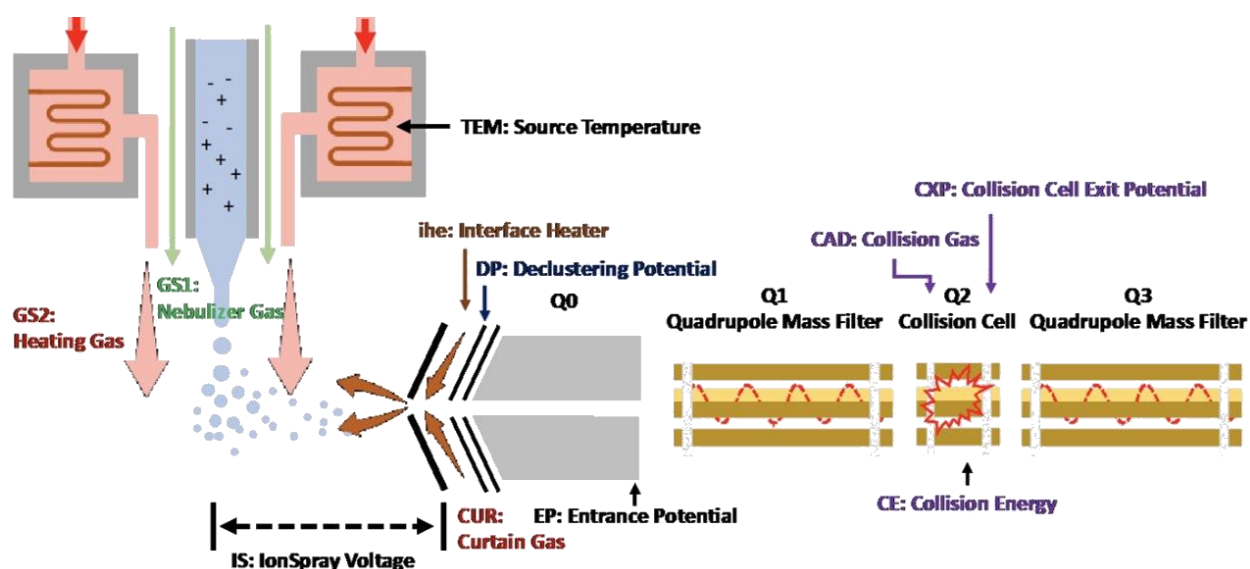


Figura 5. Parámetros por optimizar en la fuente de ionización por electro spray y espectrómetro de masas. *Nota.* Tomado de *Learn with Lin about LC-MS bioanalysis: part III tune the triple quadrupole system*, por Wang, L. & Macneill, R., 2020, Bioanalysis ZONE (https://www.bioanalysis-zone.com/learn-with-lin-about-lc-ms-bioanalysis-part-iii-tune-the-triple-quadrupole-system_covance/) (Wang & Macneill, 2020)

En la metabolómica dirigida una vez que se obtiene el cromatograma y se ha verificado que lo que se muestra es el metabolito de interés, se procede a realizar la cuantificación del metabolito, para lo cual una vez que los parámetros han sido optimizados y se va a medir la muestra, se debe realizar una curva con diferentes concentraciones del estándar para posteriormente calcular el área bajo la curva y con esto conocer la concentración del metabolito en la muestra.

2.3 Metabolitos

Los metabolitos son compuestos de bajo peso molecular que están involucrados en procesos bioquímicos, estos son productos intermedios o finales de múltiples reacciones enzimáticas (Alonso, Marsal & Julià, 2015) y procesos celulares, aunque algunos otros también son producidos por el microbioma intestinal (Mayneris-Perxachs & Fernández-Real, 2020). La importancia o interés del estudio de estos metabolitos se debe a que su análisis proporciona información sobre el funcionamiento de los organismos vivos en ciertas condiciones y en un determinado momento, ya que tanto las enfermedades como factores ambientales, la dieta, los medicamentos y los productos químicos, pueden afectar la forma en que se fabrican y son utilizados estos metabolitos.

2.4 N-Óxido de trimetilamina (TMAO)

El N-óxido de trimetilamina (TMAO) es un metabolito que se sintetiza a partir de la oxidación de la trimetilamina (TMA) de alimentos que contengan aminas cuaternarias o precursores de TMA como L- carnitina, colina, betaina, ergotioneina y la fosfatidilcolina (Janeiro, Ramírez , Milagro, Martínez & Solas, 2018). Sin embargo, el TMAO también puede provenir directamente de algunos alimentos que en su composición se encuentre el TMAO como es el caso del pescado. El TMAO es un compuesto orgánico cuya masa molecular es de 75.11 g/mol o 76 g/mol, como ion y pertenece a la clase de óxidos de amina. La función que tiene este metabolito ha sido ampliamente estudiada y se ha encontrado que sirve como un estabilizador del estado plegado de proteínas y ácidos nucleicos, y contrarresta los efectos de varios desnaturalizantes de proteínas, como la urea, el calor y la presión (Teng & Ichiye, 2019) (Gluck & Yadav, 2003) (Ma, Pazos & Gai, 2014). EL TMAO se ha encontrado que también está presente en algunos animales marinos como el pescado en donde ha mostrado funcionar como un osmolito, lo cual es de importancia en estos animales ya que ayuda a mantener el volumen celular, protegiendo a las células del estrés hidrostático y osmótico. Por otro lado, estos animales marinos, sobre todo en aquellos que son de aguas profundas, también utilizan el TMAO para contrarrestar los efectos desestabilizadores de proteínas de las presiones osmótica e hidrostática (Yancey & Siebenaller , 2015). Cuando se consumen estas aminas cuaternarias y llegan al intestino estos son metabolizados por enzimas de la microbiota

intestinal formando así TMA la cual se absorbe en el intestino y pasa a la circulación enterohepática para de esta forma llegar al hígado, una vez ahí, la TMA es oxidada principalmente por la enzima flavin monooxigenasa 3 (FMO3) generándose de esta forma el TMAO (Figura 6) (Janeiro, Ramírez, Milagro, Martínez & Solas, 2018) (Gatarek & Kaluzna-Czaplinska, 2021). En el caso de los alimentos que tienen TMAO este no sufre ningún cambio ya que solo se absorbe en intestino y pasa a la circulación sanguínea (Cho y otros, 2017) (Lombardo y otros, 2021).

Cuando existen concentraciones elevadas en plasma ($4.1 \mu\text{M}$ – $12 \mu\text{M}$, en promedio $6.8 \mu\text{M}$), el TMAO puede ocasionar efectos de hiperreactividad plaquetaria, efectos protrombóticos, los cuales incrementan el riesgo de trombosis y efectos inflamatorios (Li y otros, 2017) (Papandreou, Moré & Bellamine, 2020), aumentando así el riesgo de tener una enfermedad cardiovascular (ECV). Se ha sugerido que la hiperreactividad plaquetaria se debe a que el TMAO favorece la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares de las plaquetas lo cual lleva a la activación plaquetaria; este al liberarse de forma incrementada genera hiperreactividad plaquetaria. Por otro lado, también se ha observado que el TMAO mejora el inositol-1, 4,5-trifosfato (IP3) el cual desencadena la liberación de Ca^{2+} intracelular que lleva a la activación plaquetaria (Zhu y otros, 2016). Con respecto a los efectos inflamatorios, se ha observado que en células endoteliales aórticas humanas presentaban una respuesta proinflamatoria cuando se les exponía a altos niveles de TMAO ($200 \mu\text{M}$), esta respuesta inflamatoria incluía la inducción de COX-2, ICAM-1 y la interleucina 6 (IL-6), así como la activación de las vías la proteína cinasa activada por mitógenos y del factor nuclear -kB (NF-kB) (Papandreou, Moré & Bellamine, 2020).

Los valores normales de TMAO en suero sanguíneo no han sido definidos universalmente, sin embargo, de acuerdo con el Sonora Quest Laboratories y el HeartLab de Cleveland los valores de TMAO que indican bajo riesgo cardiovascular son $< 6.2 \mu\text{M}$, los de mediano riesgo de 6.2 a $9.9 \mu\text{M}$ y los de alto riesgo $\geq 10 \mu\text{M}$. Si bien anteriormente el TMAO había sido mayormente estudiado a través de la metabolómica en personas que hubiesen tenido algún infarto o que llevaran una dieta alta en proteína, en la actualidad este compuesto también se ha estudiado en personas sanas, con

diabetes tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia y/u obesidad. Aunado a esto, el estudio del TMAO en las distintas condiciones de salud no solo se ha enfocado en ver sus efectos o su metabolismo, sino que también se han realizado otros estudios en donde lo que se busca son estrategias para disminuir los niveles de este compuesto en el organismo a través de estrategias dietarias, compuestos bioactivos que provienen de los alimentos (Simó & García-Cañas , 2020) o a través de alimentos funcionales que son todos aquellos que además de su valor nutritivo, contienen componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido y benéfico para la salud (Beltrán , 2016).

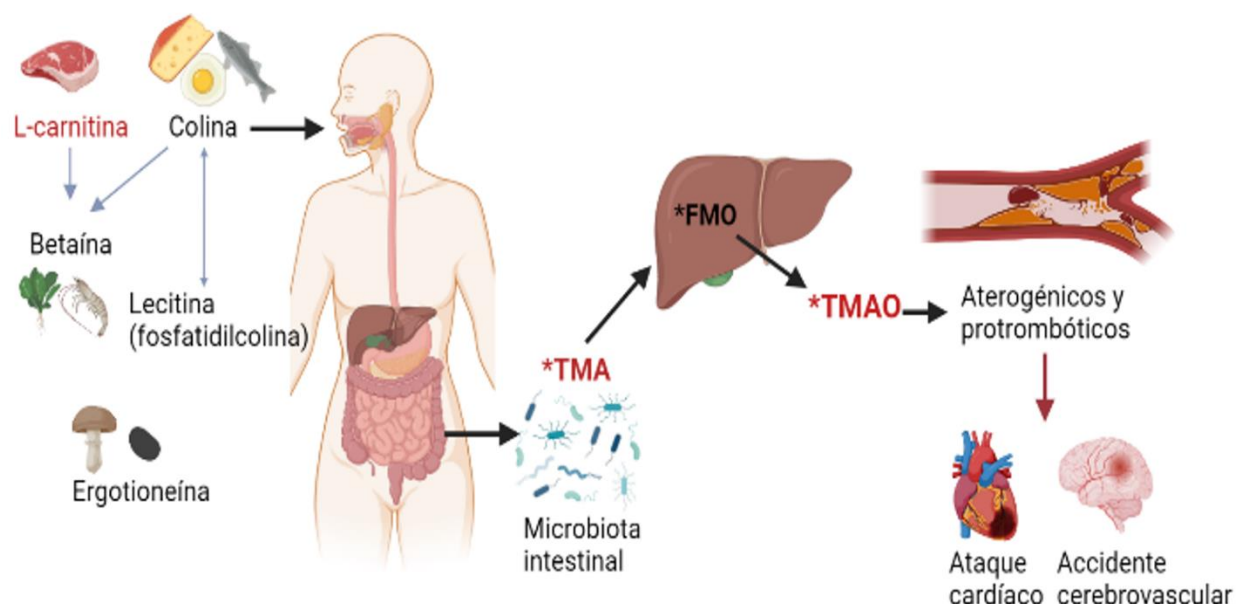


Figura 6. Vías para la formación de N-óxido de trimetilamina (TMAO). Creado con el programa bioRENDER

2.5 TMAO y síndrome metabólico.

El SM es un conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes (Lizarzaburu , 2013). Para su definición y diagnóstico se han establecido diferentes guías y concesos, la que se utiliza con mayor frecuencia es la propuesta por la del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III).

El síndrome metabólico (SM) se puede definir como un conjunto de alteraciones cardiometabólicas que se caracteriza por la presencia de tres o más de los siguientes factores: circunferencia de cintura mayor a 120 cm en hombre y mayor a 88 cm en mujeres, presión arterial mayor a 130/85 mmHg, glucosa en ayuno mayor a 100 mg/dl, triglicéridos mayores a 150 mg/dl y colesterol HDL menor a 40 mg/dl en hombre y menor a 50 mg/dl en mujeres. Existen otros consorcios en donde se incluye dentro de sus criterios a la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, microalbuminuria y/o etnia (Ascaso y otros, 2006) (Zafar, Khaliq, Ahmad, Manzoor & Lone, 2018).

Se estima que en la CDMX uno de cada dos sujetos mayores a 20 años tiene síndrome metabólico (Guevara-Cruz y otros, 2019). El SM al ser un trastorno complejo tiene un gran impacto socioeconómico en la salud mundial ya que es un factor de riesgo importante en las enfermedades cardiovasculares (ECV) así como en la diabetes tipo 2. En este sentido se ha observado que las personas que padecen diabetes tipo 2 o que tienen riesgo de tener un evento cardiovascular han mostrado tener niveles elevados de TMAO (Saif-Ali , Kamaruddin, Al-Habori, Al-Dubai & Ngah, 2020) (Shin y otros, 2013) (Shan y otros, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos en sujetos con diabetes tipo 2 (Medina-Vera y otros, 2019) han mostrado que las concentraciones de TMAO en suero son significativamente mayores en comparación con sujetos sanos e indican un riesgo de enfermedad cardiovascular. Debido a que las personas con SM tienen 5 veces más riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, la evaluación de las concentraciones de TMAO en personas con SM nos podría indicar el riesgo de estas personas a desarrollar enfermedad cardiovascular. Por lo que la determinación de óxido de trimetilamina (TMAO) en suero por espectrometría de masas podría ser un indicador de riesgo de enfermedad cardiovascular.

IV. HIPÓTESIS

Los sujetos son SM que presentan las concentraciones altas de TMAO después de recibir una intervención con un portafolio dietario a base de alimentos funcionales por dos meses mostrarán una disminución en las concentraciones de TMAO.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las concentraciones de TMAO por espectrometría de masas en muestras de suero de sujetos con síndrome metabólico.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Optimizar el proceso por espectrometría de masas para medir N-óxido de trimetilamina (TMAO) en suero humano.

5.2.2 Comparar las concentraciones de TMAO en suero antes y después de la intervención dietaria realizada en participantes con SM.

5.2.3. Identificar alguna asociación de las concentraciones de TMAO con variables antropométricas, bioquímicas, clínicas y dietéticas.

5.2.4. Relacionar las concentraciones de TMAO antes y del después de la intervención dietaria con el tipo de dieta que llevaban los participantes.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Muestra de estudio

Para el presente estudio se utilizaron muestras de suero de sujetos con síndrome metabólico de un protocolo que se llevó a cabo anteriormente en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y que se encontraban almacenadas en un ultra congelador a -80° C. Dicho protocolo fue aprobado por el comité de ética 346 y 793, para la selección de los participantes se establecieron los criterios de inclusión y de exclusión que se muestran

en la Tabla 1. Este proyecto fue un ensayo clínico pragmático que tuvo una duración de 2 meses y medio, en él se utilizó una muestra de 146 sujetos con síndrome metabólico. El estudio se dividió en dos periodos. En el primer periodo, a los participantes se les diseñó una dieta reducida en energía (500 kcal/día con respecto a su dieta habitual) y baja en grasa saturada de acuerdo con el Adult Treatment Program, por 2 semanas. Durante el segundo periodo que duró 2 meses, los participantes consumieron una dieta baja en grasa saturada en conjunto con una combinación de alimentos funcionales a la que se le denominó portafolio dietario el cual consistió en un sobre con 30 g de una mezcla de nopal deshidratado, semilla de chia, avena, proteína de soya, edulcorante sucralosa e inulina el cual se disolvía en 240 ml de agua y se tomaba 1 sobre por la mañana y otro por la noche. Estos alimentos funcionales fueron seleccionados en base a sus efectos antihiper glucémicos, antihiperinsulinémicos, hipocolesterolémicos, antiinflamatorios y antioxidantes provocados por la presencia de ácidos grasos omega-3, β -glucanos, proteína vegetal de buena calidad, fibra soluble e insoluble, polifenoles y un bajo índice glucémico. En cada uno de los dos periodos los participantes del estudio recibieron 15 planes de alimentación diferentes con la distribución que se muestra en la tabla 2. Durante el segundo periodo, los participantes continuaron consumiendo la misma dieta reducida en energía que en el primer periodo menos la energía proporcionada por el portafolio dietario que contenía la mezcla de alimentos funcionales (175/200 kcal). Para cerciorarse de que los participantes tuviesen un buen apego a la intervención a lo largo del estudio se realizó una llamada telefónica por semana a los participantes para motivarlos a que continuaran con el estudio, los planes de alimentación realizados fueron agradables para incrementar el apego, así mismo se a los participantes se les motivó dándoles talleres, recetarios y folletos sobre la importancia del plan de alimentación en el SM y por último en cada visita los participantes debían llenar un recordatorio de 24 horas para comprobar que estuviesen consumiendo lo indicado. Al final del estudio se recolectaron muestras de suero y se congelaron a -80°C .

Tabla 1. Criterio de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<p>a) Masculino y femenino.</p> <p>b) Mexicanos mestizos: padres y abuelos nacidos en México.</p> <p>c) Adultos entre 20 y 60 años.</p> <p>d) IMC > 25 y < 40 kg/m²</p> <p>e) Con 3 criterios positivos del síndrome metabólico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • glucosa > 100 a < 126 mg/dl. • Triglicéridos > 150 mg/dl. • Colesterol-HDL: hombres < 40 mg/dl y mujeres < 50 mg/dl. • Circunferencia de cintura > 88 cm en mujeres y > 102 cm en hombres. • Presión arterial ≥ 130/85mmHg (en dos días distintos). 	<p>a) Pacientes con glucosa ≥ 6.93 mmol/L (124.85 mg/dl).</p> <p>b) Paciente con cualquier tipo de diabetes.</p> <p>c) Pacientes que hayan sufrido algún evento cardiovascular.</p> <p>d) Pérdida de peso > 3 kg en los últimos 3 meses.</p> <p>e) Presencia de enfermedades como cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.</p> <p>f) Presencia de enfermedades en hígado y/o riñón.</p> <p>g) Mujeres embarazadas.</p> <p>h) Tabaquismo positivo.</p> <p>i) Consumo de alcohol.</p> <p>j) Tratamiento con alguno de los siguientes medicamentos: Antihipertensivos, hipoglucemiantes, insulina, antidiabéticos, estatinas, fibratos u otro para el control de dislipidemias, esteroides, quimioterapia, inmunosupresores, radioterapia, anorexigénicos, droga o medicamento que activen la motilidad intestinal y/o antibióticos.</p>

Tabla 2. Composición del plan de alimentación.

Componente	Cantidad
Proteína	Aproximadamente, 15% de las calorías totales.
Grasas totales	25 – 35% de las calorías totales
Grasa saturada	< 7% de las calorías totales
Grasa poliinsaturada	Hasta un 10% de las calorías totales
Grasa monoinsaturada	Hasta un 20% de las calorías totales
Colesterol	<200 mg/día
Hidratos de carbono	50 – 60% de las calorías totales
Fibra	20 – 30 g/día.

Para el presente trabajo se utilizaron un total 128 muestras (64 muestras de suero recolectadas antes de la intervención y 64 muestras recolectadas después de la intervención).

6.2 Optimización de parámetros para la separación y cuantificación de TMAO por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

La determinación de TMAO en el suero de los pacientes se realizó en una plataforma de metabolómica dirigida comprendida por un cromatógrafo de líquidos (UPLC-Exion LC AD) acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS) (6500+Qtrap AB Sciex). La optimización de los parámetros del MS se realizó de manera automática por infusión directa y por análisis de flujo por inyección (AIF). En estos experimentos, el espectrómetro de masas aplica diferentes voltajes para encontrar las condiciones óptimas de ionización, selección y fragmentación del metabolito y muestra aquellos

valores en donde la intensidad del ion padre o hijo es mayor. En primera instancia se optimizaron distintos parámetros para la detección del TMAO y de la obtención de su patrón de fragmentación para la selección de las transiciones. Estas últimas son elementales para realizar la cuantificación del metabolito.

Estos parámetros incluyen, el potencial de entrada (PE), el potencial para evitar que los iones formen clústeres (PD), la energía de colisión (EDC) y el potencial de salida de la celda de colisión (PSCC). Posteriormente, se realizó la optimización de los parámetros de la fuente de ionización y desolvación del TMAO. Las condiciones optimizadas fueron el voltaje del ionspray (IS), la temperatura para evaporar las gotas formadas, la presión del gas nebulizador (GS1), el gas 2 (GS2) y la cortina de gas (CDG). Las condiciones optimizadas se muestran en la Tabla 2 de la sección 7.1 de resultados. Por último, ya teniendo las condiciones, se procedió a detectar de manera adecuada al TMAO.

La optimización de la determinación de TMAO por cromatografía líquida se empleó un estándar de TMAO para así determinar las condiciones a usar en la cromatografía (ver sección 7.1 de resultados) y de esta forma conocer el tiempo de retención del TMAO y definir su pico cromatográfico, posteriormente se inyectó suero para corroborar que dichas condiciones fueran óptimas para la separación del TMAO en las muestras de suero.

6.3 Extracción del metabolito de muestras de suero.

Los sueros almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de los sujetos con síndrome metabólico se descongelaron en frío y posteriormente se centrifugaron en una centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend micro 21R a $14\ 000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Para realizar la desproteinización de las muestras se tomaron $100\ \mu\text{l}$ de suero y se agregaron $800\ \mu\text{l}$ de metanol al 100% frío ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), se incubaron durante 30 min en hielo y se centrifugaron a $14\ 000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se transfirió y se secó en un concentrador Speedvac (Savant SPD121P). Una vez concentrada la muestra se resuspendió en $200\ \mu\text{l}$ de metanol. Finalmente, se hizo una dilución 1:200 de la muestra con metanol, para finalmente inyectarse $3\ \mu\text{l}$ de la dilución en el UPLC (Figura 7). Cabe

mencionar que algunas muestras presentaban en el cromatograma grandes picos que se salían de la curva estándar, por lo que se tuvieron que hacer diluciones más grandes.

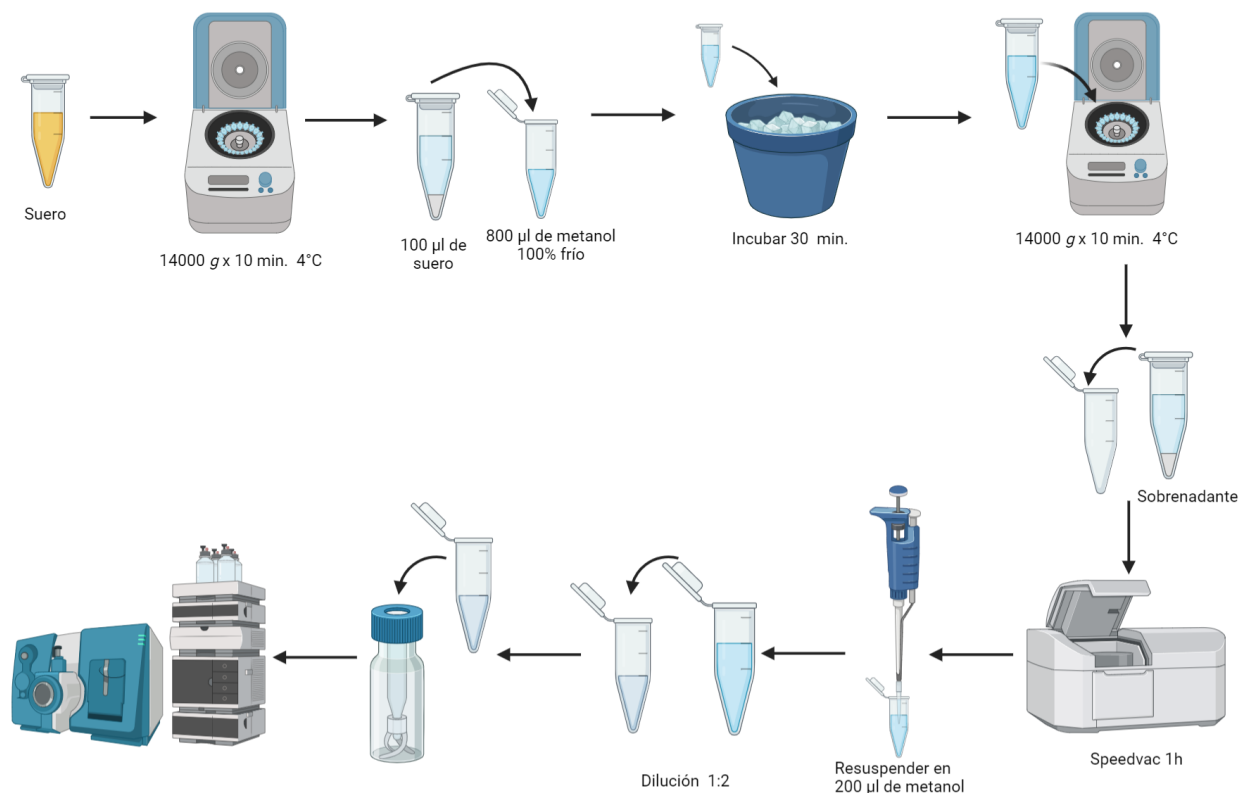


Figura 7. Proceso de extracción del metaboloma de muestras de suero y su inyección a LC-MS/MS. Creado con el programa bioRENDER.

6.4 Cuantificación de TMAO.

Para la cuantificación del TMAO se utilizó el software SCIEX OS el cual considera el área bajo la curva del pico de TMAO de cada muestra y el valor lo interpola en una curva de calibración realizada con el estándar puro. Se realizó una curva de calibración utilizando el estándar puro de TMAO (Trimethylamine N-oxide 95%, Sigma-Aldrich; CAS 317594) disuelto en agua desionizada grado masas. Las concentraciones utilizadas en la curva incluyen, 0.0078 µM, 0.0312 µM, 0.0625 µM, 0.125 µM, 0.25 µM y 0.5 µM. La curva de calibración se construyó utilizando el valor del área bajo la curva; la concentración de las muestras se calculó utilizando una ecuación lineal.

6.5 Cuantificación de niveles de C-HDL, C-LDL, TG, glucosa y determinación de lipopolisacárido.

Todas las muestras de sangre de los sujetos se obtuvieron después de un ayuno de entre 8 a 12 horas. Posteriormente, se centrifugaron las muestras de sangre a una velocidad de 3000 rpm por 10 minutos y se separó el plasma, el cual se mantuvo a una temperatura de -80°C hasta su análisis (Guevara-Cruz, y otros, 2019).

- a) Perfil de lípidos: Las concentraciones en suero y plasma de colesterol total y de los triglicéridos se determinaron por métodos enzimáticos (cobas c 111). El C-HDL y C-LDL se determinaron por método homogéneo, enzimático y colorimétrico (cobas c111) (Guevara-Cruz, y otros, 2019).
- b) La concentración de glucosa en suero se determinó por radiación ultravioleta y método enzimático de referencia empleando hexocinasa (cobas c111) (Guevara-Cruz, y otros, 2019).
- c) La determinación de lipopolisacárido se realizó a través de un Kit de ELISA (Cloud-Clone Corp) (Guevara-Cruz, y otros, 2019).

6.6 Análisis de resultados.

El análisis de las concentraciones de TMAO de todos los sujetos en estudio se realizó utilizando el software GraphPad Prism 7 y R. Se calculó la media de las concentraciones de TMAO para conocer que sujetos presentaban altas concentraciones de TMAO. Posteriormente se realizó una prueba de correlación de rango Spearman para identificar las relaciones del TMAO con otras variables y se realizó una prueba t-student no pareada para determinar las diferencias entre los niveles de TMAO en mujeres y hombres. Por último, se llevó a cabo una prueba de t-student pareada para identificar los cambios que tuvieron los sujetos con SM y altas concentraciones de TMAO antes y después de una intervención a base de una combinación de alimentos funcionales.

VII. RESULTADOS

7.1 Optimización del método de cuantificación de TMAO por LC-MS/MS.

Para la determinación de los niveles de TMAO en suero primero se optimizó el método de separación e identificación de este metabolito por LC-MS/MS utilizando un Exion LC-AD acoplado a un sistema SCIEX QTRAP 6500+. De la optimización automática, se obtuvieron las condiciones para obtener las transiciones que permiten cuantificar y cualificar TMAO (Figura 8). Se eligieron dos transiciones, la de mayor intensidad (59 m/z) para llevar a cabo la cuantificación y una con menor intensidad para corroborar que lo que se estaba midiendo fuera el compuesto de interés (Ver Tabla 3). Así mismo, de la optimización de análisis por flujo de inyección (AFI) se obtuvieron los parámetros de ionización que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Condiciones para la obtención de los patrones de fragmentación del TMAO.

Compuesto	Ion padre m/z	Ion producto m/z	PD (EV)	PE (V)	EDC (V)	PSCC (V)
TMAO	76	58	51	10	25	26
		59	51	10	17	28

*Potencial de declustering (PD), Potencial de entrada (PE), Energía de colisión (EDC) y Potencial de salida de la celda de colisión (PSCC).

Tabla 4. Parámetros de la fuente de ionización.

Parámetro	
CDG	20
Voltaje ionspray	3000
Temperatura fuente	300

GS1	40
GS2	40

*Cortina de gas (CDG), Gas nebulizador (GS1) y Gas de secado (GS2)

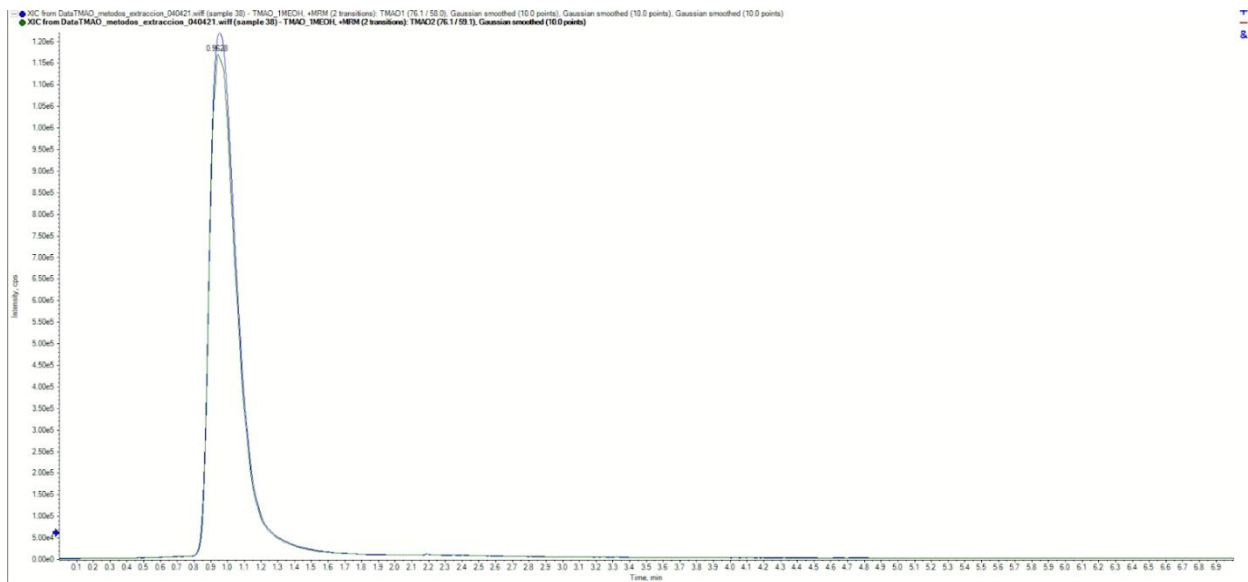


Figura 8. Cromatograma de las transiciones utilizadas para la detección y cuantificación de un estándar de TMAO.

Para la separación por cromatografía del TMAO en suero se utilizó cromatografía de fase normal con una columna HILIC 100 Å Kinetex Core-Shell technology 2.6 μ m 30 mm x 2.1 mm (Phenomenex) a 40°C y a un flujo de 0.4 mL/minutos. El buffer A estaba compuesto de agua desionizada grado MS (JT Baker) con 40 mM de formato de amonio como modificador (Sigma Aldrich), y el buffer B de metanol grado MS al 100 % (JT Baker). El gradiente de separación utilizado consistió en los siguientes pasos: 0-1 min, equilibrado de la columna con 90 % de B; 1–5 min, un gradiente lineal de 90 - 10 % B; 5 - 6.5 min, un lavado 10 % B; 6.50 – 6.60 min de un gradiente de 10 - 90 % B para regresar a las condiciones iniciales y 6.60 – 7 min. de equilibrado de la columna con 90 % B. El TMAO se detectó mediante su tiempo de retención y su fragmentación resultantes de la aplicación de las condiciones mostradas en esta sección.

7.2 Niveles de N-óxido de trimetilamina en sujetos con síndrome metabólico.

En la figura 9 se muestra que la media de las concentraciones de TMAO en sujetos con SM fueron de $3.462 \mu\text{M} \pm 3.472$, valores que se encontraban dentro de los parámetros de bajo riesgo cardiovascular de acuerdo con el Sonora Quest Laboratories y el HeartLab de Cleveland ($< 6.2 \mu\text{M}$), sin embargo, al observar por separado algunas muestras se encontró que siete sujetos presentaron niveles por arriba de los reportados. Un sujeto presentó concentraciones de $6.984 \mu\text{M}$ y seis presentaron concentraciones de TMAO superiores a todas las demás ($9.332 \mu\text{M}$, $10.908 \mu\text{M}$, $11.917 \mu\text{M}$, $11.923 \mu\text{M}$, $12.405 \mu\text{M}$, $21.040 \mu\text{M}$).

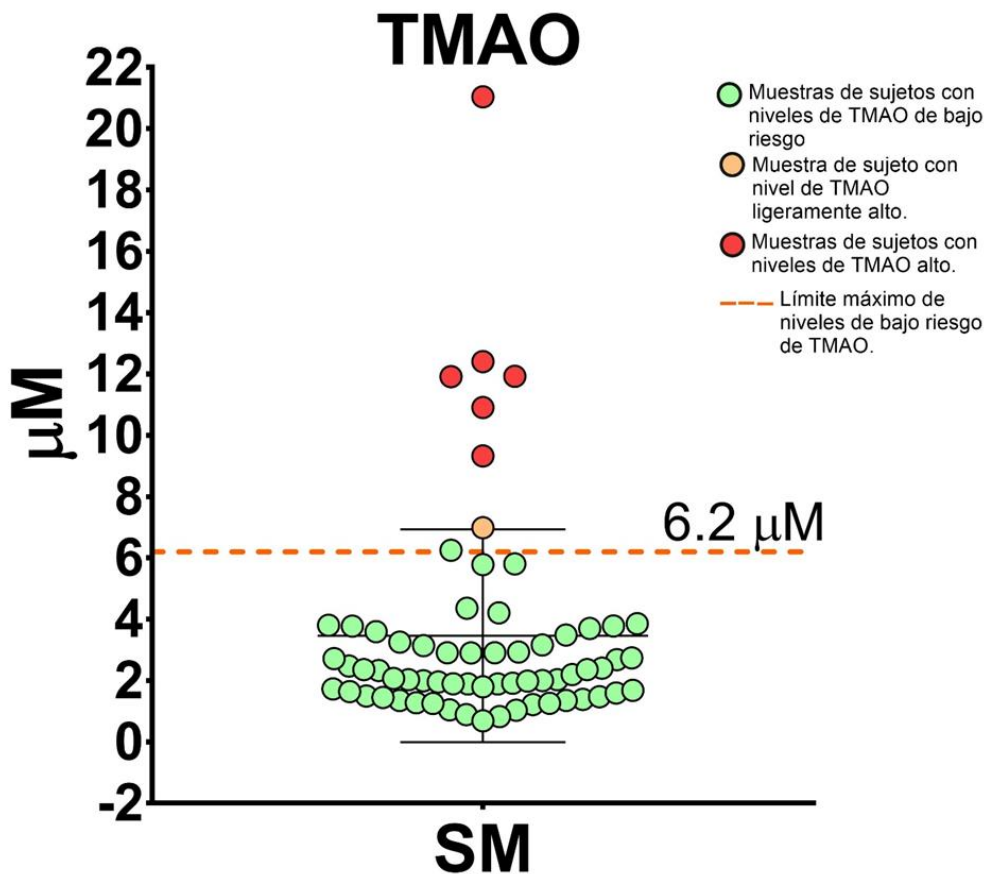


Figura 9. Concentraciones de TMAO en sujetos con síndrome metabólico.

Se analizaron los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), colesterol total (CT), triglicéridos

(TG) y glucosa observándose que algunos de los 7 sujetos con altas concentraciones de TMAO presentaron niveles de glucosa, colesterol, C-LDL y triglicéridos por encima de los niveles recomendados y niveles de C-HDL por debajo de lo recomendado como se muestra en la tabla 5. Después de hacer un análisis de estos parámetros bioquímicos se observó que la media en las concentraciones de glucosa en estos 7 sujetos fue de 92.586 mg/dL \pm 11.514, 195.085 mg/dl \pm 45.742 en el CT, 36.843 mg/dl \pm 9.413 en el C-HDL, 136.443 mg/dl \pm 42.290 en el C-LDL y de 176.443 mg/dl \pm 49.589 en los TG.

Tabla 5. Concentraciones de parámetros bioquímicos, concentraciones de TMAO y edad de 7 sujetos con SM y TMAO elevado.

ID	EDAD	TMAO μ M	CT. mg/dl	C-HDL mg/dl	C-LDL mg/dl	TG mg/dl	GLUCOSA mg/dl
27	50	6.9	258.7	43	179.2	174	83.8
158	50	9.3	230.7	45.2	183.4	147.7	102.4
98	23	10.9	179.4	41.1	110.7	174.6	85.6
105	53	11.9	135.2	27.1	88.3	170	104
157	51	11.9	211.8	46	161.3	112.4	100
159	50	12.4	208.9	33.3	149.8	275.2	98.5
198	36	21	140.9	22.2	82.4	181.2	73.8

Posteriormente con una prueba de rango Spearman se buscó la presencia de alguna relación entre las concentraciones de TMAO de todos los sujetos con algún parámetro bioquímico, antropométrico o patrón dietario de estos sujetos con SM. Los resultados de este análisis mostraron la presencia de una relación positiva significativa ($p= 0.006$, $r= 34$) entre las concentraciones de TMAO con los gramos de proteína por kilogramo de peso (gProt/kg de peso) que los sujetos con SM consumieron un día antes de la toma de la muestra (calculados a partir del análisis de un recordatorio de 24 horas). Por otro lado, las variables que mostraron una asociación negativa con el TMAO fueron las concentraciones de lipopolisacárido (LPS) en suero ($p= 0.033$, $r= .28$) (Figura 10).

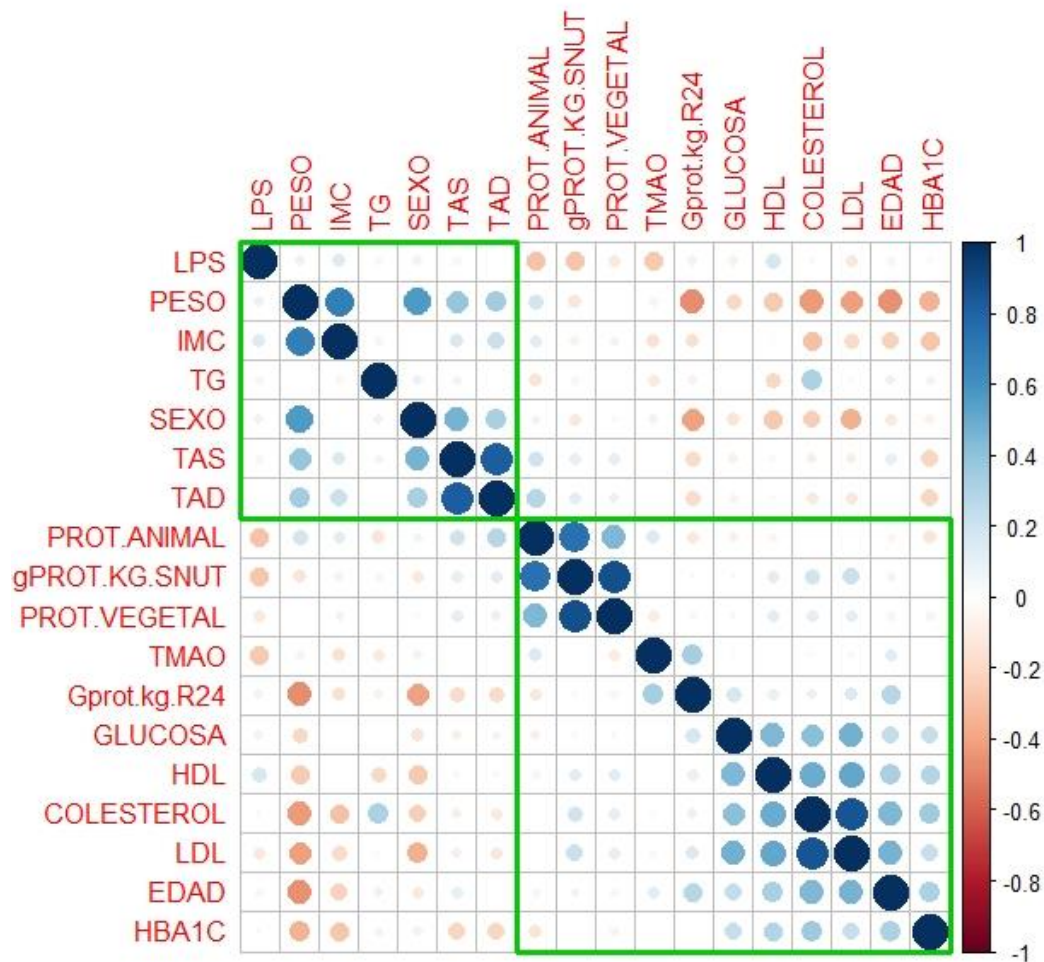


Figura 10. Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 64 sujetos con síndrome metabólico utilizando R software.

A los 7 sujetos que presentaron concentraciones de TMAO elevados se les realizó un análisis más a profundidad de su dieta a través de los cuestionarios de consumo de frecuencia de alimentos y recordatorios de 24 horas. Estos recordatorios mostraban la frecuencia de los tipos de alimentos que habían consumido en aproximadamente 1 año y los gProt/kg de peso que habían consumido un día antes de la toma de muestra, así como los gProt/kg de peso que consumían de forma habitual y cuánta de esa proteína era de origen animal y vegetal (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de TMAO, cantidad de proteína animal, proteína vegetal y gProt/kg de peso consumidos de forma habitual y un día antes de la toma de muestra de 7 sujetos con SM y TMAO elevado.

ID	Concentración de TMAO 1 μM	gPROT/Kg R24	gPROT/Kg SNUT	Cantidad PROT. ANIMAL g	de Cantidad de PROT. VEGETAL g
27	6.9	1.1	0.9	37.6	24.1
158	9.3	0.7	0.9	52	27.2
98	10.9	0.4	0.8	31.7	42.9
105	11.9	2.1	0.7	47.2	25.1
157	11.9	0.9	1	47.1	30.6
159	12.4	0.8	0.2	15	6.7
198	21	0.9	0.8	59.1	20.8

gPROT/Kg R24: gramos de proteína por kilogramo de peso consumidos 24 horas antes de la toma de muestra. gPROT/Kg SNUT

Posteriormente se realizó una prueba de correlación de rango Spearman de los 7 sujetos con TMAO elevado para identificar la existencia de la relación del TMAO con los gPROT/Kg de peso consumidos 24 horas antes de la toma de muestra, los gramos de proteína animal y vegetal que consumían habitualmente, la glucosa y C-HDL en ayuno y la edad (Figura 11), de este análisis se observó una correlación positiva ($p= 0.028$, $r= .6$) entre las concentraciones de TMAO y los gramos de proteína animal consumidos de forma habitual.

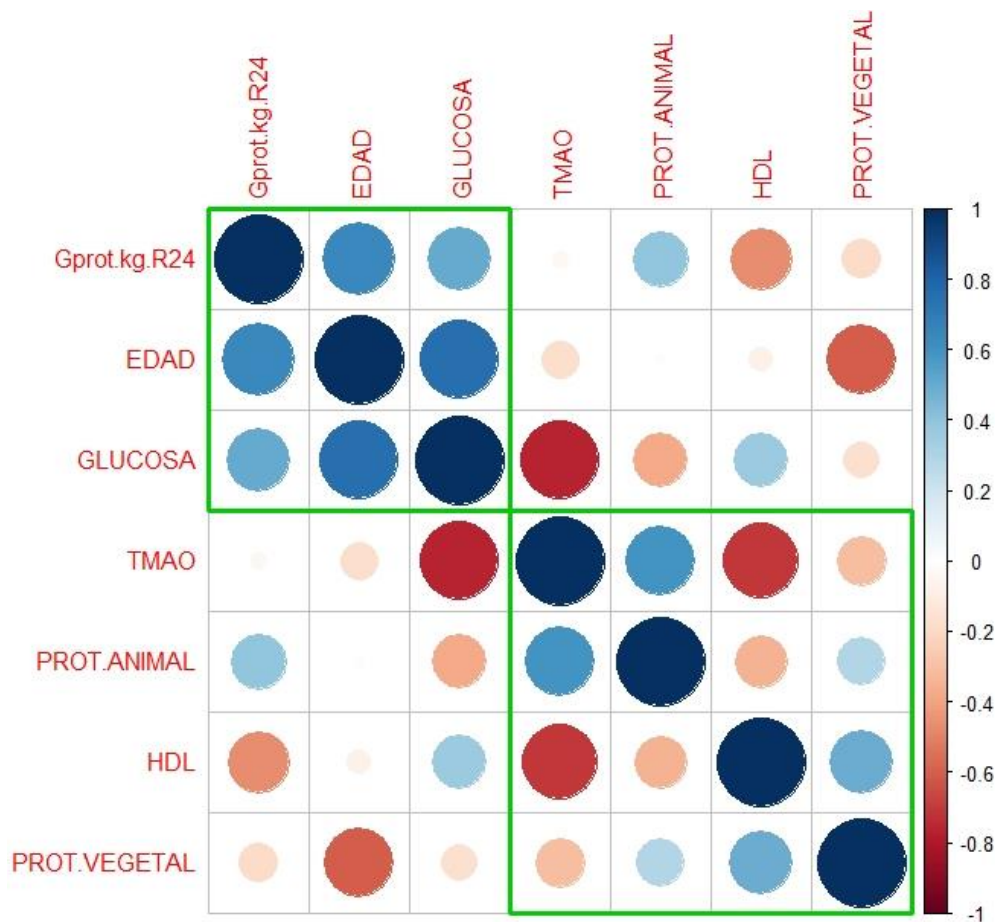


Figura 11. Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 7 sujetos con síndrome metabólico y TMAO elevado utilizando R software.

También se analizó la frecuencia del consumo de los distintos alimentos que son conocidos por contener precursores de TMA y TMAO por parte de los 7 sujetos con SM y niveles altos de TMAO. Se encontró que los alimentos que consumieron por más de una vez a la semana fueron leche entera, huevo, pollo, jamón, carne de res, frijoles, papa y espinacas (Tabla 7). Cabe mencionar que algunos de estos alimentos también habían estado presentes en las comidas de un día anterior a la toma de muestra de los sujetos lo cual podría explicar las concentraciones altas de TMAO de estos 7 sujetos.

Tabla 7. Alimentos con precursores de TMA y TMAO consumidos frecuentemente por 7 sujetos con síndrome metabólico y concentración de TMAO elevado.

ID	Huevo	Carne de res	Pollo	Carne de puerco	Jamón	Leche	Frijol	Papa	Espinaca
27									
158	C	F	D	E	D	C		D	D
98	C	C	C	D	C		B	A	F
105	C	C	C	C		C		C	C
157	D	C	C	C	C	B	C	C	D
159	C	D	F	E	D	D	C	D	F
198	C	C	C	D	C		D	D	E

A: 2 – 3 veces al día, B: 1 vez al día, C: 2 – 4 a la semana, D: 1 vez a la semana, E: < 1 vez al mes y F: 1 -3 veces al mes.

Una vez que se obtuvieron los alimentos con precursores de TMA y con TMAO, se realizó una búsqueda en el FoodData Central de la usda.gov <https://fdc.nal.usda.gov/> y en el National Institute of Health Office of Dietary Supplements (National Institute of Health Office of Dietary Supplements , 2022) (National Institutes of Health Office of Dietary Supplements, 2023) para conocer los mg contenidos de los precursores en los alimentos (Figura 12).

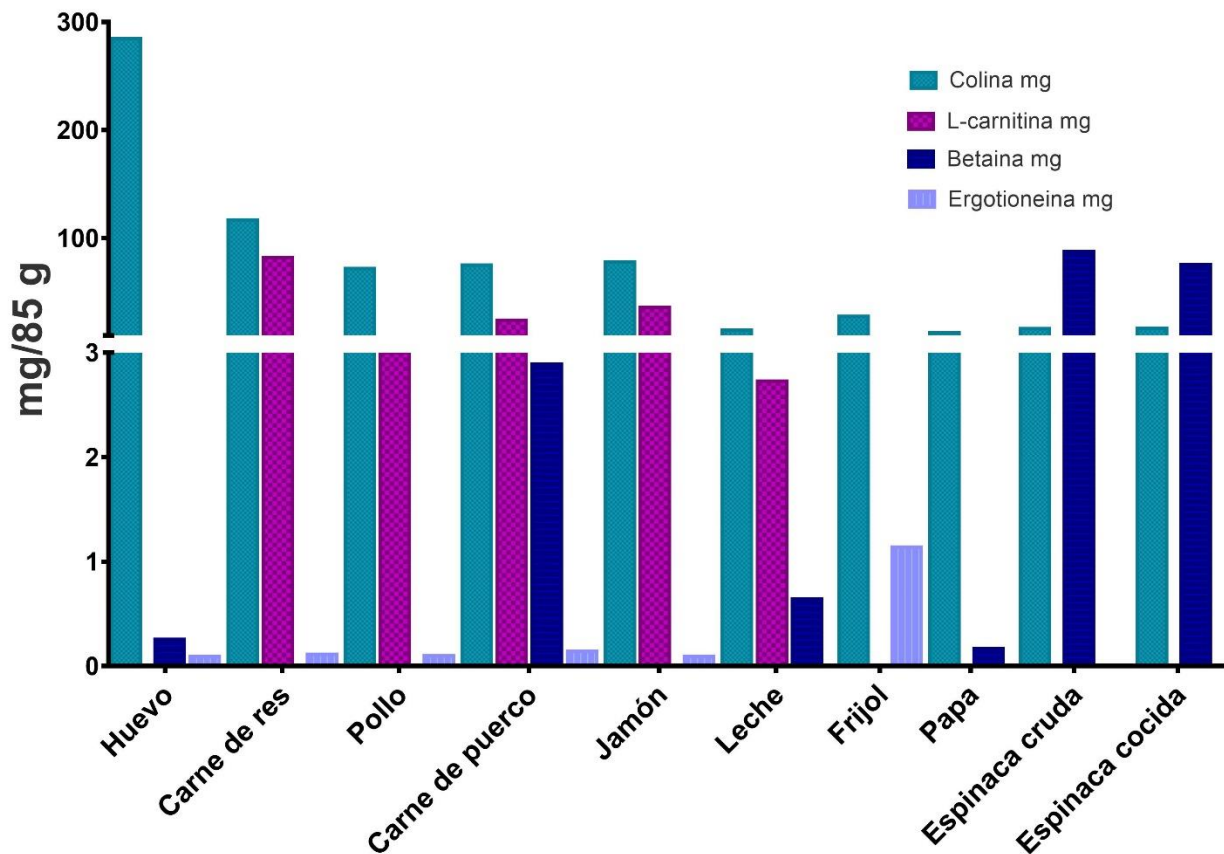


Figura 12. Concentración de colina, L-carnitina, betaina y ergotioneina (mg) en alimentos.

Por otro lado, las muestras de los sujetos con síndrome metabólico se analizaron para identificar si había diferencias entre los valores dependiendo el sexo (Figura 13). Por un lado, la media en mujeres (n= 47) de los niveles de TMAO fue de $3.367 \mu\text{M} \pm 2.776$, en cuanto a los hombres (n=17) la media fue de $3.929 \mu\text{M} \pm 5.116$.

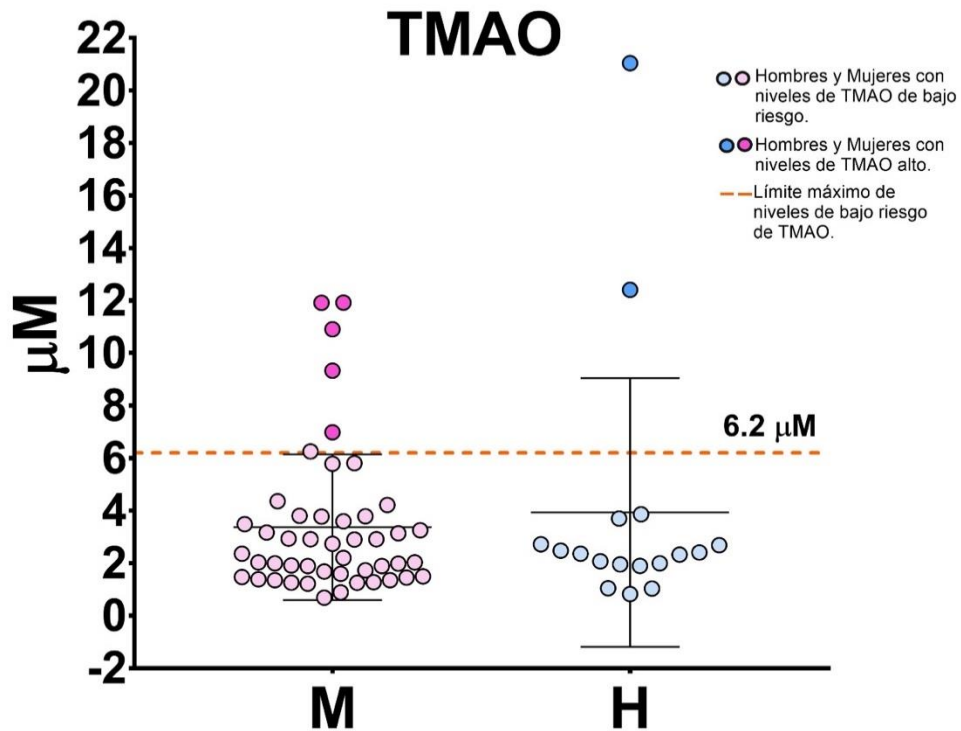


Figura 13. Concentraciones de TMAO en sujetos con síndrome metabólico por sexo.

Posteriormente se llevaron a cabo dos pruebas de correlación de rango Spearman para ver si las concentraciones de TMAO en mujeres y hombres se relacionaban de forma similar con las distintas variables bioquímicas, antropométricas y dietéticas. Se observó que tanto en las mujeres (figura14) como en los hombres los gProt/kg de peso consumidos un día antes a la toma de la muestra se asociaban de forma positiva a los niveles de TMAO obtenidos (hombres $p= 0.010$, $r= .6$ y mujeres $p= 0.018$, $r= .34$). Con respecto a los hombres se observó una relación negativa de los niveles de TMAO con LPS ($p= 0.015$) (figura 15).

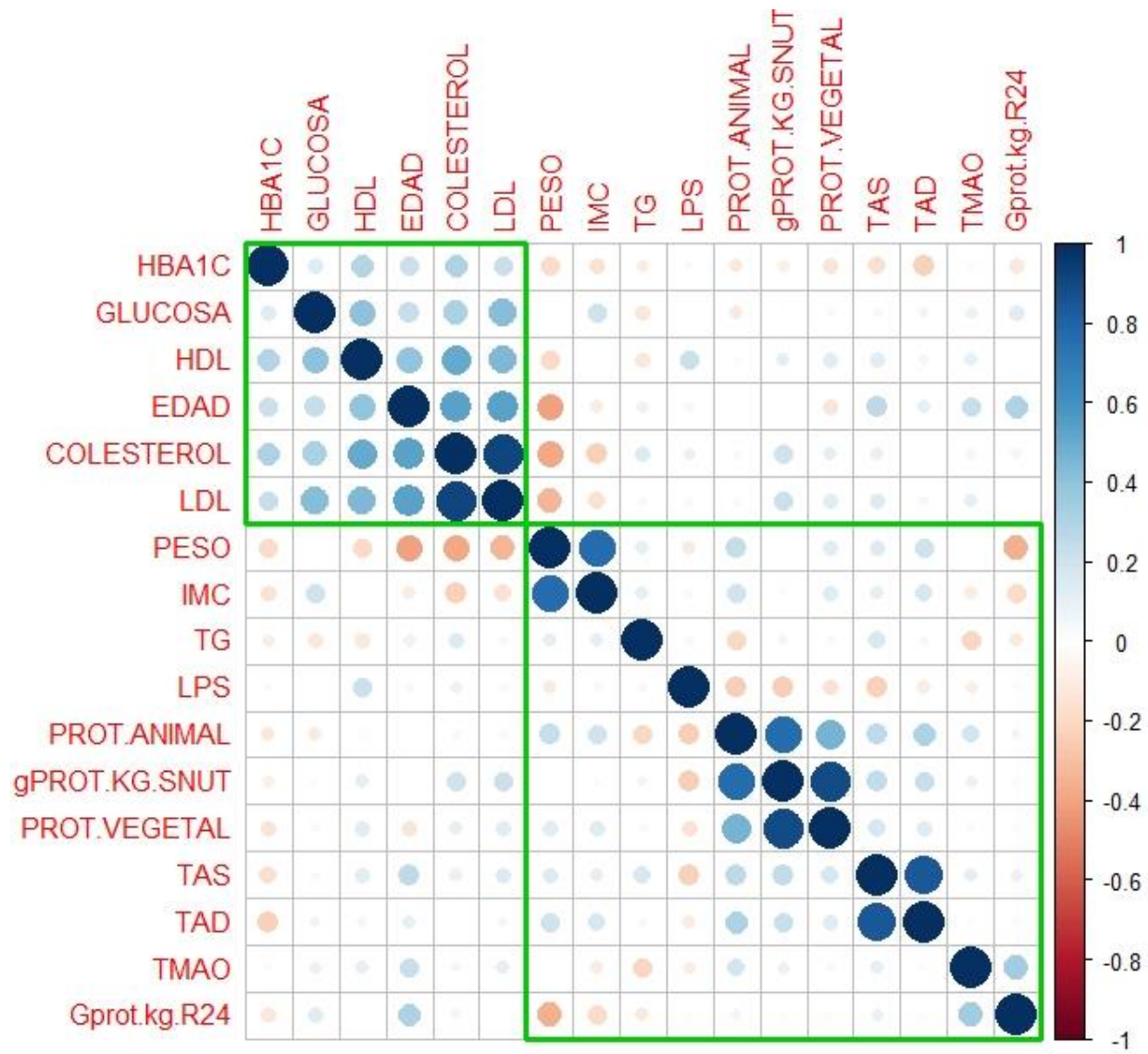


Figura 14. Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 47 mujeres con síndrome metabólico utilizando R software.

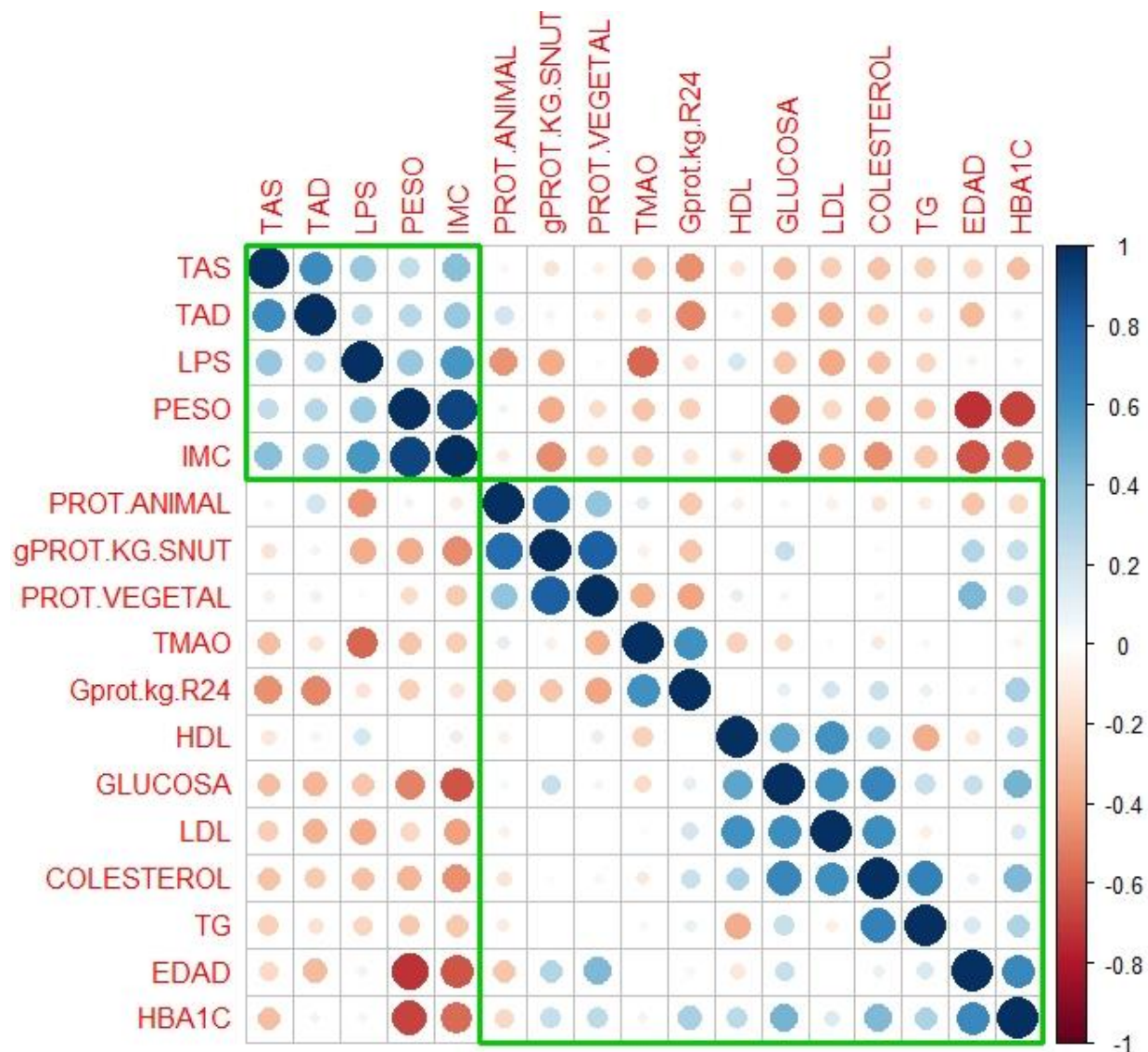


Figura 15. Correlaciones entre variables bioquímicas, antropométricas, dietarias y TMAO en 17 hombres con síndrome metabólico utilizando R software.

7.3 Cambios en los niveles de N-óxido de trimetilamina después de una intervención dietaria.

Para evaluar la existencia de cambios en los niveles de TMAO en sujetos con SM se realizó la medición de las muestras de suero de los sujetos con SM después de 2 meses de haber recibido una intervención dietara a base de alimentos funcionales (portafolio

dietario) (Figura 16). La media de los niveles de TMAO después de la intervención fue de $5.086 \mu\text{M} \pm 2.397$ lo cual comparado con los valores de la media inicial ($3.462 \mu\text{M} \pm 3.472$) mostró un incremento de los valores de TMAO. Al realizar una prueba estadística t-test pareada se encontró que ese cambio fue significativo ($p= 0.030$). Al hacer este mismo análisis por sexo se observó que solo en las mujeres ($n= 47$) estos cambios habían sido significativos ($p= 0.0002$) en comparación con los hombres ($n= 17$) en quienes estos cambios no fueron significativos ($p= 0.26$), sin embargo, se debe considerar que hay una diferencia en el tamaño de la muestra de cada grupo.

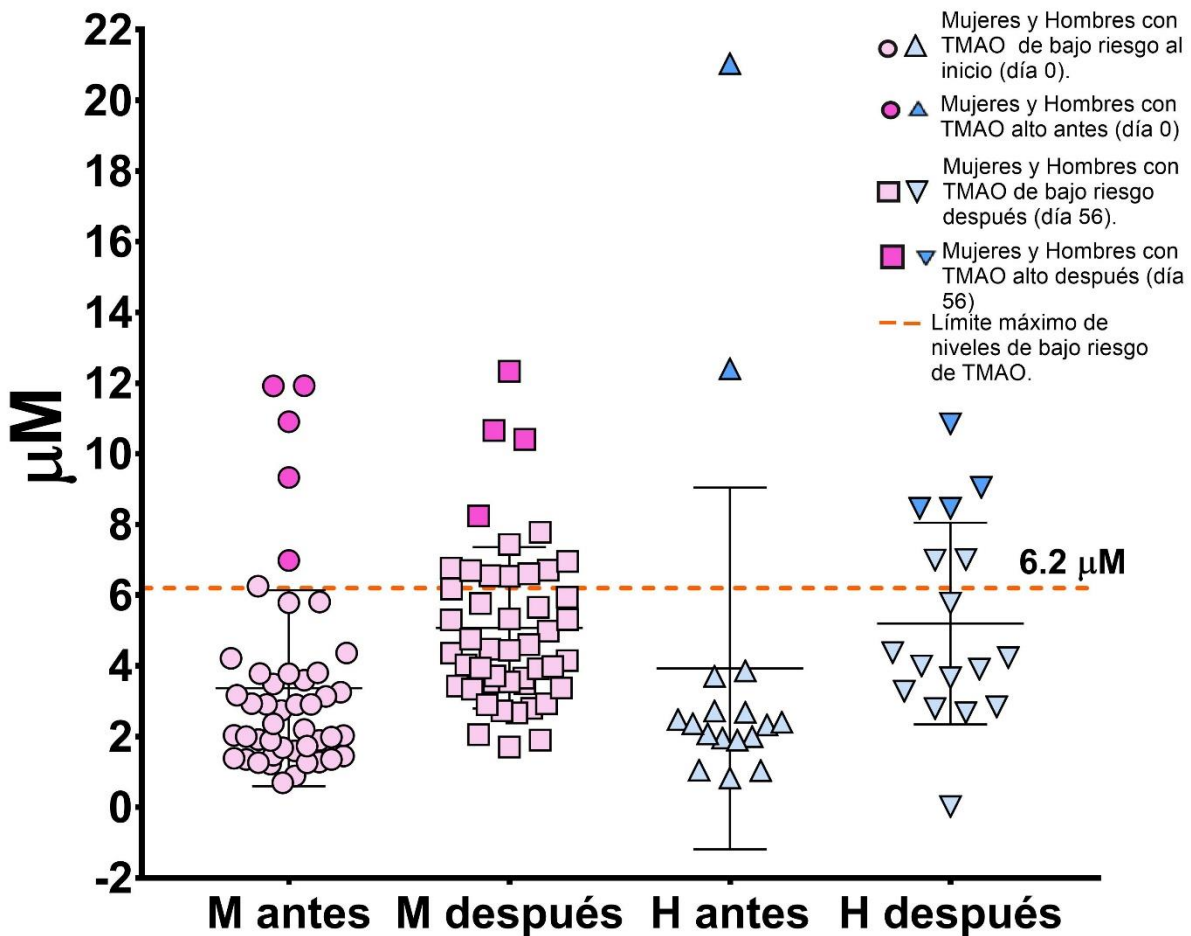


Figura 16. Cambios en las concentraciones de TMAO en 47 mujeres y 17 hombres con síndrome metabólico después de una intervención dietaria con alimentos funcionales.

Dado los resultados en concentraciones de TMAO después de una intervención dietaria con un portafolio a base de alimentos funcionales, se decidió evaluar los cambios que se presentaron únicamente en las 7 muestras de los sujetos con SM que antes de la intervención habían mostrado tener niveles altos de TMAO. Lo que se observó fue una disminución en la media de los niveles de TMAO en comparación con la media inicial ($12.07 \mu\text{M} \pm 4.384$ vs. $7.718 \mu\text{M} \pm 1.926$). Al realizar una prueba t- test pareado se mostró que esta disminución fue significativa ($p= 0.030$) (Figura 17). Adicionalmente se evaluaron nuevamente los gProt/kg de peso que habían ingerido estos 7 sujetos 24 horas antes de la toma de muestra y se compararon con respecto a los gramos que reportaron haber consumido en la primera evaluación y lo que se observó fue que en algunos casos los gProt/kg de peso que habían consumido fueron ligeramente menores a los de la primera ocasión, sin embargo, otros habían mantenido la misma ingesta de gProt/kg de peso o incluso la habían incrementado un poco (Tabla 8).

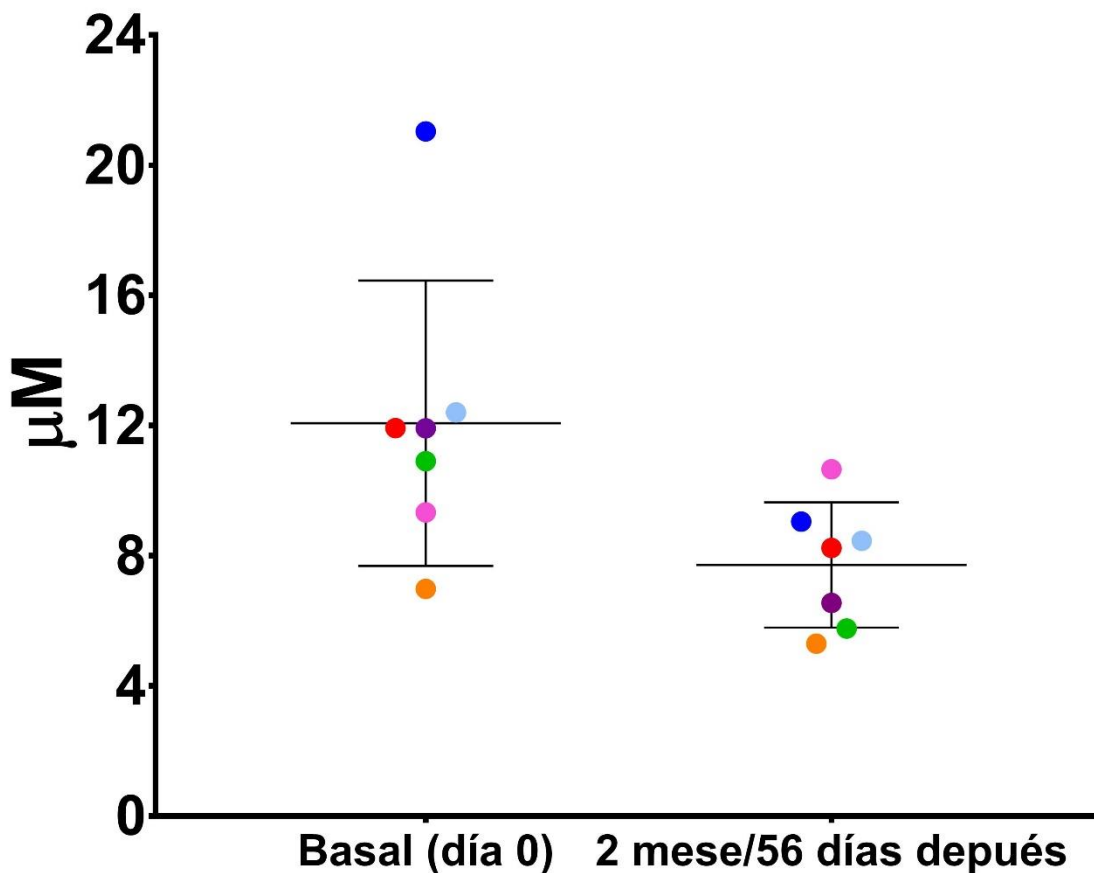


Figura 17. Cambio en las concentraciones de TMAO de 7 sujetos con síndrome metabólico que presentaban concentraciones altas de TMAO al inicio de la intervención dietaria.

Tabla 8. Concentraciones de TMAO en suero y gProt/kg de peso consumidos 24 horas antes de la toma de muestra antes y después de una intervención dietaria en 7 sujetos con síndrome metabólico y concentraciones iniciales de TMAO elevadas.

ID	TMAO 1 (µM)	TMAO 2 (µM)	gPROT/kg R24 1	gPROT/kg R24 2
27	6.9	5.3	1.1	0.9
158	9.3	10.6	0.7	1.1
98	10.9	5.7	0.4	0.7
105	11.9	6.5	2.1	0.8
157	11.9	8.2	0.9	1
159	12.4	8.4	0.8	0.8
198	21	9	0.9	0.7

VIII. DISCUSIÓN

El estudio de la metabolómica dirigida en sujetos con enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición nos abre un gran panorama sobre qué metabolitos estudiar y porqué. Se ha reportado que las concentraciones de TMAO están elevadas en los sujetos con diabetes tipo 2, (Medina-Vera y otros, 2019) (Lever y otros, 2014) (Dambrova y otros, 2016) (Malinowska, Szwengiel & Chmurzynska, 2017), sin embargo, se observó que la mayoría de los sujetos con SM presentaban concentraciones de TMAO dentro de los valores normales (Me= 2.3 µM). Se han reportado niveles de TMAO en personas con SM de 2.046 µM (Kuo, Liu, Wang & Hsu, 2022), muy parecidos a los reportados en este

estudio. En otro estudio en donde se buscó identificar al TMAO como un biomarcador temprano de predicción para SM, se encontró que sujetos con obesidad grado III y presencia de SM tenían niveles de TMAO de $11.53 \pm 9.96 \mu\text{M}$ (Barrea L. y otros, 2018), indicando que la metodología a utilizar y el tipo de población puede producir grandes diferencias.

De las 64 muestras analizadas en este estudio, 7 de ellas mostraron niveles muy por encima de la mediana, esto fue debido al tipo de dieta que llevaban estos sujetos. El análisis de los 7 sujetos con SM que tuvieron concentraciones de TMAO elevado confirmó que había una relación positiva entre los gramos de proteína animal ingeridos y el TMAO, esto último concuerda con algunos estudios que muestran las variaciones que hay en las concentraciones de TMAO en sujetos que consumen una mayor cantidad de proteína de origen animal (Rasmussen y otros, 2012) (Koeth y otros, 2013) (Stella y otros, 2006).

Se ha reportado que solo algunos alimentos de origen animal influyen más en las concentraciones de TMAO, por lo que se realizó una búsqueda de los tipos de alimentos que estos 7 sujetos habían consumido con frecuencia. Se observó que los alimentos de origen animal que más consumieron fueron el huevo, carne de res, pollo, carne de puerco, jamón y leche, los cuales contienen precursores de TMA (Janeiro, Ramírez, Milagro, Martínez & Solas, 2018) (National Institute of Health Office of Dietary Supplements, 2022, 2023) lo cual pudo haber sido la causa de que estos sujetos en particular tuvieran las concentraciones de TMAO elevado. En un estudio realizado en ratones en donde se evaluaron los efectos de la administración de colina, betaína y L-carnitina a través de la dieta se observó que la tasa de producción de TMAO a partir de L-carnitina, presente en la carne roja, es más rápida en comparación con la betaína (Yu y otros, 2020). La colina que se encuentra en la yema de huevo fue uno de los alimentos que en su mayoría los 7 sujetos consumían de forma cotidiana. En varios estudios indican que algunos de los alimentos que tienden a modificar las concentraciones de TMAO son el queso, leche entera, yogurt, champiñones, huevo, pan blanco, mantequilla, carne roja, pescado e incluso la comida rápida (Shin y otros, 2013) (Andraos y otros, 2020) (Simó & García-Cañas, 2020) de los cuales algunos de ellos coinciden con los que más fueron

consumidos por los sujetos con síndrome metabólico. En otros estudios realizados en sujetos de ambos sexos, en un rango de edad de 20 – 71 años y aparentemente sanos de Alemania e Italia se encontró una relación positiva entre los niveles de TMAO y el consumo de pescado, carne roja y productos lácteos, pero no con huevo (Krüger y otros, 2017) (Barrea L. y otros, 2019). Un estudio en donde participaron 104 sujetos se encontró que los participantes que consumían grandes cantidades de leche entera (37.9 [15.1]-59.1 [10.4,141] g/d) mostraban una mayor concentración en los niveles de TMAO (Rohrmann, Linseisen , Allenspach, Eckardstein & Müller, 2016) lo cual es similar a lo que se observó en 3 de los 7 sujetos con TMAO elevado y que en su cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos reportaron haber consumido leche entera antes del estudio y durante el estudio. Sin embargo, Andraos et. al. (2020) encontró en otro estudio, en donde la ingesta de leche no se asociaba con el incremento de TMAO. Todo lo anterior sugiere que el incremento de TMAO no solo depende de la alimentación o del tipo de alimento, sino que hay otros factores involucrados, como la microbiota intestinal o la actividad de la enzima FMO en hígado (Zhu y otros, 2018) ya que se ha observado que algunos compuestos presentes en las crucíferas pueden disminuir o inhibir la actividad de esta enzima causando una disminución en los niveles de TMAO. Así mismo, se ha observado que la actividad de FMO es diferente en hombres y mujeres siendo la FMO3 más activa en las mujeres ya que la testosterona parece inhibir la FMO (Janeiro, Ramírez , Milagro, Martínez & Solas, 2018) (Zhu y otros, 2018), en este sentido una de las limitaciones en este proyecto fue el tamaño total de la muestra de hombres y mujeres ya había más mujeres que hombres (47 mujeres y 17 hombres).

Un punto que hubiese resultado interesante conocer era cuánto tiempo después de haber consumido alguno de los alimentos mencionados en la tabla 7 de la sección de resultados se pueden ver cambios en los niveles de TMAO debido a que en un estudio realizado por Miller, y cols, 2014 se observó que el aumento en los niveles de TMAO en orina y plasma era de forma dosis dependiente cuando se consumieron por una sola vez 2 o más yemas de huevo, alcanzándose los niveles más altos entre 6 y 8 horas después de su consumo. En otro estudio realizado por Cho y cols, 2017 se observó que los niveles de TMAO en circulación se incrementaban después de 15 minutos de haber consumido pescado, lo cual muy posiblemente se debe a que el pescado es un alimento que

contiene TMAO y este al no sufrir ningún cambio y ser absorbido directamente en intestino puede incrementar de forma rápida el TMAO en circulación. Otro estudio realizado por Giesbertz y otros, 2020 mostró que la ingesta de carne mantuvo los niveles de TMAO por encima de las basales incluso 24 horas después de haber ingerido dicho alimento. Lo anterior es de importancia ya que los sujetos al haber consumido un día antes de la toma de muestra alguno o varios alimentos que tuvieran precursores de TMA (precursor de TMAO) o bien que contuviera TMAO, es posible que los valores se pudieran haber visto afectados.

En el presente estudio al analizar las concentraciones de TMAO después de dos meses después de que consumieron un portafolio a base de alimentos funcionales, se observó que las concentraciones de TMAO se encontraban dentro de valores normales. Sin embargo, al analizar solo a los 7 sujetos que antes de la intervención mostraron tener un TMAO elevado se encontró que los niveles de TMAO de 6 sujetos habían disminuido de forma significativa. Existe información sobre que el consumo de avena y fibra disminuyen las concentraciones de TMAO (Zhang y otros, 2015), la suplementación con fibra ocasiona un cambio en la microbiota intestinal que está involucrada en la formación de TMA y en consecuencia de TMAO (Zhang y otros, 2015), pero esto aún está en discusión ya que en otro estudio se muestra lo contrario (Bergeron y otros, 2016).

Con respecto a las 57 muestras que no mostraron cambios significativos en los niveles de TMAO fue posiblemente debido a que la administración de un portafolio a base de alimentos funcionales y proteína de origen vegetal evitó que aumentaran las concentraciones de TMA, sin embargo, hay que considerar otros factores como dieta, sexo, edad, ciclo menstrual, actividad de la enzima FMO y/o microbiota pueden afectar la producción de TMAO (Janeiro, Ramírez , Milagro, Martínez & Solas, 2018)

El TMAO es un compuesto de mucho interés en la actualidad y aún quedan muchas preguntas por responder y otras respuestas que quizá aún no están del todo claras debido a los diferentes resultados que se encuentran entre estudios, sin embargo, el uso de la metabolómica y el desarrollo de más estudios contribuirán a obtener más información sobre este metabolito.

IX. CONCLUSIONES

- El uso de metabolómica dirigida permite la identificación y cuantificación de un metabolito de interés con mayor precisión, en el caso del presente proyecto del TMAO.
- Los niveles de TMAO en la mayoría de los sujetos con SM se encuentran dentro de los valores normales según los criterios del Cleveland HeartLab, sin embargo, pueden presentarse algunas excepciones en donde algunos factores como la dieta causen niveles anormalmente elevados.
- La intervención dietaria con un portafolio a base de alimentos funcionales evitó que las concentraciones de TMAO aumentaran en los 2 sujetos y 5 mujeres con SM.
- El consumo de un portafolio dietario a base de alimentos funcionales disminuyó las concentraciones de TMAO en sujetos que tenían altas concentraciones de este metabolito antes de la intervención.
- Se encontró que el consumo de proteína animal se asociaba con concentraciones más altas de TMAO.

Referencias

(s.f.). Obtenido de UAB Metabolomics - Metabolomics Workshop :

<https://www.uab.edu/proteomics/metabolomics/workshop/2014/Ray%202014%20MRM%20Development%20Demo.pdf>

Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3(23).
doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>

Andraos , S., Lange, K., Clifford , S., Jones, B., Thorstensen, E., Kerr, J. A., Wake, M., Saffery, R., Burgner, D. P., & O'Sullivan, J. M. (2020). Plasma Trimethylamine N-Oxide and Its Precursors: Population Epidemiology, Parent–Child Concordance, and Associations with Reported Dietary Intake in 11- to 12-Year-Old Children and Their Parents. *Current Developments in Nutrition*, 4(7).
doi:<https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa103>

- Ascaso, J., González-Santos, P., Mijares, A., Mangas, A., Masana, L., Millan, J., Pallardo, L., Botet, J., Pérez, F., Pinto, X., Plaza, I., Rubiés, J., Zúñiga, M. (2006). Diagnóstico de síndrome metabólico. Adecuación de los criterios diagnósticos en nuestro medio. *Clínica e Investigación en Aterioesclerosis*, 18(6), 244-260. doi:[https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(06\)73697-X](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(06)73697-X)
- Barrea, L., Annunziata, G., Muscogiuri, G., Laudisio, D., Somma, C., Maisto, M., Tenore, G. C., Colao, A., & Savastano, S. (2019). Trimethylamine N-oxide, Mediterranean diet, and nutrition in healthy, normal-weight adults: also a matter of sex?. *Nutrition*, 62, 7-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.11.015>
- Barrea, L., Annunziata, G., Muscogiuri, G., Somma, C., Laudisio, D., Maisto, M., de Alteriis, G., Tenore, G. C., Colao, A., & Savastano, S. (2018). Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as Novel Potential Biomarker of Early Predictors of Metabolic Syndrome. *nutrients*, 10(12). doi:<https://doi.org/10.3390/nu10121971>
- Beltrán, M. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia profesional*, 30(3), 12-14.
- Bergeron, N., Williams, P., Lamendella, R., Faghini, N., Grube, A., Li, X., Wang, Z., Knight, R., Jansson, J. K., Hazen, S. L. & Krauss, R. M. (2016). Diets high in resistant starch increase plasma levels of trimethylamine-N-oxide, a gut microbiome metabolite associated with CVD risk. *The British journal of nutrition*, 116(12), 2020–2029. doi:<https://doi.org/10.1017/S0007114516004165>
- Bruins, A. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794, 345-357. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2)
- Cho, C., Taesuwan, S., Malysheva, O., Bender, E., Tulchinsky, N., Yan, J., Sutter, J. L., & Caudill, M. A. (2017). Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Molecular nutrition & food research*, 1(61). doi:<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600324>
- Dambrova, M., Latkovskis, G., Kuka, J., Strele, I., Konrade, I., Grinberga, S., Hartmane, D., Pugovics, O., Erglis, A., & Liepinsh, E. (2016). Diabetes is Associated with Higher Trimethylamine N-oxide Plasma Levels. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 124(4), 251–256. doi:<https://doi.org/10.1055/s-0035-1569330>
- Gatarek, P. & Kaluzna-Czaplinska, J. (2021). Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health. *EXCLI journal*(20), 301–319. doi:<https://doi.org/10.17179/excli2020-3239>
- Giesbertz, P., Brandl, B., Lee, Y.-M., Hauner, H., Daniel, H. & Skurk, T. (2020). Specificity, Dose Dependency, and Kinetics of Markers of Chicken and Beef Intake Using Targeted Quantitative LC-MS/MS: A Human Intervention Trial. *Molecular nutrition & food research*, 64(5). doi:<https://doi.org/10.1002/mnfr.201900921>

- Glish, G. & Vachet, R. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(2), 140-150. doi:<https://doi.org/10.1038/nrd1011>
- Gluck, T. & Yadav, S. (2003). Trimethylamine N-oxide stabilizes RNA tertiary structure and attenuates the denaturing effects of urea. *Journal of the American Chemical Society*, 125(15), 4418-4419. doi:<https://doi.org/10.1021/ja0292997>
- Guevara-Cruz, M., Flores-López, A., Aguilar-López, M., Sánchez-Tapia, M., Medina-Vera, I., Díaz, D., Tovar, A. R. & Torres, N. (2019). Improvement of Lipoprotein Profile and Metabolic Endotoxemia by a Lifestyle Intervention That Modifies the Gut Microbiota in Subjects With Metabolic Syndrome. *Journal of the American Heart Association*, 8(17). doi:<https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012401>
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W. & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3-12. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18568044/>
- Janeiro, M., Ramírez, M., Milagro, F., Martínez, J. & Solas, M. (2018). Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients*, 10(10). doi:<https://doi.org/10.3390/nu10101398>
- Klassen, A., Faccio, A., Canuto, G., da Cruz, P., Ribeiro, H., Tavares, M. & Sussulini, A. (2017). Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. *Advances in experimental medicine and biology*, 3-17. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_1
- Koeth, R., Wang, Z., Levison, B., Buffa, J., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H., Bushman, F., Lusis, A. & Hazen, S. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*, 19(5), 576-585. doi:<https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Krüger, R., Merz, B., Rist, M., Ferrario, P., Bub, A., Kulling, S. & Watzl, B. (2017). Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Molecular nutrition & food research*, 61(11). doi:<https://doi.org/10.1002/mnfr.201700363>
- Kuo, C.-H., Liu, C.-H., Wang, J.-H. & Hsu, B.-G. (2022). Serum Trimethylamine N-Oxide Levels Correlate with Metabolic Syndrome in Coronary Artery Disease Patients. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi:<https://doi.org/10.3390/>
- Lever, M., George, P., Slow, S., Bellamy, D., Young, J., Ho, M., McEntyre, C. J., Elmslie, J. L., Atkinson, W., Molyneux, S. L., Troughton, R. W., Frampton, C. M., Richards, A. M. & Chambers, S. T. (2014). Betaine and Trimethylamine-N-Oxide as Predictors of Cardiovascular Outcomes Show Different Patterns in Diabetes Mellitus: An Observational Study. *PLoS one*, 9(12). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114969>

- Li, X., Obeid, S., Klingenberg, R., Gencer, B., Mach, F., Räber, L., Windecker, S., Rodondi, N., Nanchen, D., Muller, O., Miranda, M. X., Matter, C. M., Wu, Y., Li, L., Wang, Z., Alamri, H. S., Gogonea, V., Chung, Y. M., Tang, W. H., Hazen, S. L. & Lüscher, T. (2017). Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *European heart journal*, *11*(38), 814–824. doi:<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw582>
- Lizarzaburu, J. R. (2013). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *An. Fac. med.*, 315-320.
- Lombardo, M., Aulisa, G., Marcon, D., Rizzo, G., Tarsisano, M., Renzo, L., Federici, M., Caprio, M., & De Lorenzo, A. (2021). Association of Urinary and Plasma Levels of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) with Foods. *Nutrients*, *5*(13). doi:<https://doi.org/10.3390/nu13051426>
- Ma, J., Pazos, I. & Gai, F. (2014). Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *23*(11), 8476–8481. . doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1403224111>
- Malinowska, A., Szwengiel, A. & Chmurzynska, A. (2017). Dietary, anthropometric, and biochemical factors influencing plasma choline, carnitine, trimethylamine, and trimethylamine-N-oxide concentrations. *International journal of food sciences and nutrition*, *68*(4), 488-495. doi:<https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1256379>
- Mayneris-Perxachs, J. & Fernández-Real, J.-M. (2020). Exploration of the microbiota and metabolites within body fluids could pinpoint novel disease mechanisms. *The FEBS journal*, *5*(287), 856-865. doi:<https://doi.org/10.1111/febs.15130>
- Medina-Vera, I., Sanchez-Tapia, M., Noriega-López, L., Granados-Portillo, O., Guevara-Cruz, M., Flores-López, A., Avila-Nava, A., Fernández, M. L., Tovar, A. R. & Torres, N. (2019). A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*, *45*(2), 122-131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.09.004>
- Miller, C., Corbin, K., da Costa, K.-A., Zhang, S., Zhao, X., Galanko, J., Blevins, T., Bennett, B. J., O'Connor, A. & Zeisel, S. H. (2014). Effect of egg ingestion on trimethylamine-N-oxide production in humans: a randomized, controlled, dose-response study. *The American journal of clinical nutrition*, *100*(3), 778–786. doi:<https://doi.org/10.3945/ajcn.114.087692>
- National Institute of Health Office of Dietary Supplements . (2 de 05 de 2022). Obtenido de Choline: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Choline-HealthProfessional/>
- National Institutes of Health Office of Dietary Supplements. (7 de 02 de 2023). Obtenido de Carnitine: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/carnitine-healthprofessional/>

- Papandreou, C., Moré, M. & Bellamine, A. (2020). Trimethylamine N-Oxide in Relation to Cardiometabolic Health-Cause or Effect?. *Nutrients*, 5(12). doi:<https://doi.org/10.3390/nu12051330>
- Putri, S., Yamamoto, S., Tsugawa, H. & Fukusaki, E. (2012). Current metabolomics: Technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1-8. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.004
- Rasmussen, L. G., Winning, H., Savorani, F., Toft, H., Larsen, T. M., Dragsted, L. O., Astrup, A. & Engelsen, S. B. (2012). Assessment of the effect of high or low protein diet on the human urine metabolome as measured by NMR. *Nutrients*, 4(2), 112-131. doi:<https://doi.org/10.3390/nu4020112>
- Roberts, L. D., Souza, A. L. & Gerszten, R. E. (2012). Targeted metabolomics. En F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. Seidman, & J. A. Smith, *Current protocols in molecular biology*.
- Roberts, L., Souza, A., Gerszten, R. & Clish, C. (2012). Targeted metabolomics. En *Current protocols in molecular biology*. doi:10.1002/0471142727.mb3002s98
- Rohrmann, S., Linseisen, J., Allenspach, M., Eckardstein, A. & Müller, D. (2016). Plasma Concentrations of Trimethylamine-N-oxide Are Directly Associated with Dairy Food Consumption and Low-Grade Inflammation in a German Adult Population. *The Journal of nutrition*, 146(2), 283-289. doi:<https://doi.org/10.3945/jn.115.220103>
- Saif-Ali, R., Kamaruddin, N., Al-Habori, M., Al-Dubai, S. & Ngah, W. (2020). Relationship of metabolic syndrome defined by IDF or revised NCEP ATP III with glycemic control among Malaysians with Type 2 Diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*. doi:<https://doi.org/10.1186/s13098-020-00575-7>
- Shan, Z., Sun, T., Huang, H., Chen, S., Chen, L., Luo, C., Yang, W., Yang, X., Yao, P., Cheng, J., Hu, F. B. & Liu, L. (2017). Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 106(3), 888–894. doi:<https://doi.org/10.3945/ajcn.117.157107>
- Shin, J.-A., Lee, J.-H., Lim, S.-Y., Ha, H.-S., Kwon, H.-S., Park, Y.-M., Lee, W. C., Kang, M. I., Yim, H. W., Yoon, K. H. & Son, H. Y. (2013). Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *Journal of diabetes investigation*, 4(4), 334–343. doi:<https://doi.org/10.1111/jdi.12075>
- Simó, C. & García-Cañas, V. (2020). Dietary bioactive ingredients to modulate the gut microbiota-derived metabolite TMAO. New opportunities for functional food development. *Food & Function*. doi:10.1039/D0FO01237H
- Stella, C., Beckwith-Hall, B., Cloarec, O., Holmes, E., Lindon, J., Powell, J., van der Ouderaa, F., Bingham, S., Cross, A. J. & Nicholson, J. K. (2006). Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *Journal of proteome research*, 5(10), 2780-2788. doi:Journal of proteome research

- Teng, X. & Ichiye, T. (2019). Dynamical Effects of Trimethylamine N-Oxide on Aqueous Solutions of Urea. *The journal of physical chemistry. B*, 5(123), 1108-1115. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b09874>
- Wang, L. & Macneill, R. (22 de Octubre de 2020). *Bioanalysis ZONE*. Obtenido de Learn with Lin about LC–MS bioanalysis: part III tune the triple quadrupole system: https://www.bioanalysis-zone.com/learn-with-lin-about-lc-ms-bioanalysis-part-iii-tune-the-triple-quadrupole-system_covance/
- Yancey, P. & Siebenaller, J. (2015). Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms. *The Journal of experimental biology*(218), 1880–1896. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yu, Z.-L., Zhang, L.-Y., Jiang, X.-M., Xue, C.-H., Chi, N., Zhang, T.-T. & Wang, Y.-M. (2020). Effects of dietary choline, betaine, and L-carnitine on the generation of trimethylamine-N-oxide in healthy mice. *Journal of food science*, 85(7), 2207-2215. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15186>
- Zafar, U., Khaliq, S., Ahmad, H., Manzoor, S. & Lone, K. (2018). Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones*, 3(17), 299–313. . doi:<https://doi.org/10.1007/s42000-018-0051-3>
- Zhang, C., Yin, A., Li, H., Wang, R., Wu, G., Shen, J., Zhang, M., Wang, L., Hou, Y., Ouyang, H., Zhang, Y., Zheng, Y., Wang, J., Lv, X., Wang, Y., Zhang, F., Zeng, B., Li, W., Yan, F., Zhao, Y., Pang, X., Zhang, X., Fu, H., Chen, F., Zhao, N., Hamaker, B., Bridgewater, L., Weinkove, D., Clement, K., Dore, J., Holmes, E., Xiao, H., Zhao, G., Yang, S., Bork, P., Nicholson, J., Wei, H., Tang, H. Zhang, X. & Zhao, L. (2015). Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children. *EBioMedicine*, 2(8), 968–984. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.007>
- Zhu, W., Buffa, J., Wang, Z., Warriar, M., Schugar, R., Shih, D. M., Gupta, N., Gregory, J. C., Org, E., Fu, X., Li, L., DiDonato, J. A., Lusic, A. J., Brown, J. M. & Hazen, S. L. (2018). Flavin monooxygenase 3, the host hepatic enzyme in the metaorganismal trimethylamine N-oxide-generating pathway, modulates platelet responsiveness and thrombosis risk. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 16(9), 1857–1872. doi:<https://doi.org/10.1111/jth.14234>
- Zhu, W., Gregory, J., Org, E., Buffa, J., Gupta, N., Wang, Z., Li, L., Fu, X., Wu, Y., Mehrabian, M., Sartor, R. B., McIntyre, T. M., Silverstein, R. L., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Brown, J. M., Lusic, A. J. & Hazen, S. L. (2016). Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*, 165, 111-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>