

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis exploratorio del metaboloma de individuos
con deterioro cognitivo pertenecientes a la cohorte
de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en adultos
mayores de México (COSFAMM)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Jorge Hurtado Soriano

DIRECTOR

Dr. Juan Carlos Gómez Verjan

CODIRECTOR

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Mauricio Castañón Arreola, UACM-PCG

Secretario: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM-PCG

Vocal: Dr. Juan Carlos Gómez Verjan, INGER

1^{er}. Suplente:

2^{do}. Suplente:

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dr. Juan Carlos Gómez Verjan

INGER

CODIRECTOR

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
UACM

Agradecimientos Institucionales

PROYECTO INGER

Se agradece a la M. en C. Jessica Hernández Pineda, del Laboratorio de Farmacología Experimental y Laboratorio de Infectología e Inmunología, ambos ubicados en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, (INPerIER), donde se procesaron los sueros en el UPLC-MS/MS.

El diseño experimental se realizó con la ayuda del Dr. Edgar Antonio Estrella Parra, la Dra. Karla Daniela Reyes Hernández y la alumna de Maestría en Ciencias Biológicas Selma Karime Castillo Vazquez, en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química a cargo del Dr. Ricardo Reyes Chilpa y las muestras de suero por la Dra. Nadia Alejandra Rivero Segura del Instituto Nacional de Geriátrica (INGER).

Se agradece también al Dr. Juan Carlos Gomez Verjan del INGER y la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por su guía en el diseño, revisión y ejecución del presente proyecto, sus consejos fueron necesarios para poder concluir con éxito la presente.

Agradecimientos a Título Personal

Le agradezco a mis padres por su ayuda y respaldo en este proceso, ya que sin ellos no se habría logrado la conclusión y sobre todo a mi madre, quien estuvo presente apoyándome y guiándome en todo momento que la necesité. Así como por su ayuda monetaria y consejos para superar ciertos obstáculos del proyecto.

Índice

Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras.....	7
Abreviaturas.....	8
1. Resumen.....	11
2. Introducción.....	12
2.1 Envejecimiento.....	12
2.2 Pilares Moleculares del Envejecimiento.....	13
2.3 Metabolómica.....	19
2.4 Deterioro Cognitivo.....	25
3. Antecedentes Particulares.....	28
3.1 Metaboloma y envejecimiento.....	28
3.2 Relación entre el deterioro cognitivo (DC) y el metaboloma.....	33
3.3 Estudios de Metabolómica en México.....	37
4. Hipótesis.....	40
5. Justificación.....	40
6. Objetivos.....	41
6.1 Objetivo general.....	41
6.2 Objetivos particulares.....	41
7. Estrategia Experimental.....	42
8. Materiales y métodos.....	43
8.1 Selección de muestras de suero en el estudio exploratorio de perfiles de metabolómica.....	43
8.1.1 Muestras de la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad de Adultos Mayores Mexicanos” (COSFAMM).....	43
8.1.2 Características de las muestras de suero seleccionadas de la COSFAMM.....	44
8.2 Identificación y construcción de metabolomas.....	45
8.2.1 Obtención de fracciones ricas en metabolitos.....	45
8.2.2 Separación de metabolitos de baja resolución con cromatografía líquida de alta eficiencia.....	46
8.2.3 Pre-procesamiento de espectros e identificación de metabolitos.....	49
8.2.4 Construcción del metaboloma por alineamiento de los grupos.....	49
8.3 Identificación de la abundancia de los metabolitos en adultos mayores con deterioro cognitivo.....	50
8.3.1 Normalización de conjunto de metabolomas.....	50
8.3.2 Análisis Estadísticos del Metaboloma de DC y SDC.....	50
8.4 Identificación de vías metabólicas alteradas en DC.....	51
8.4.1 Análisis de Vías de Señalización y enriquecimiento.....	51
9. Resultados.....	51

10. Discusión.....	66
11. Conclusiones.....	70
12. Perspectivas.....	70
13. Bibliografía.....	71
14. Anexos.....	79
14. 1 Aspectos éticos y de bioseguridad.....	79
14.2 Resultados del ANOVA de una vía y estudio post-hoc.....	79
14.3 Resultados de sPLSDA.....	82

Índice de Tablas.

Tabla 1. Escala de Mini-examen del estado mental (MMSE).....	46
Tabla 2. Separación del suero por gradiente en la columna.....	49
Tabla 3. Características de las muestras de suero utilizadas en el estudio.....	53
Tabla 4. Resumen del perfil metabólico del Deterioro Cognitivo (DC).....	63
Tabla 5. Resultados de metabolitos significativos encontrados en DC y SDC.....	83

Índice de Figuras.

Figura 1. Representación gráfica de los doce pilares del envejecimiento.....	14
Figura 2. Tecnologías Ómicas.....	20
Figura 3. Factores que influyen en el deterioro cognitivo.....	27
Figura 4. Características de los estudios en metabolómica en adultos mayores de los últimos años.....	30
Figura 5. Esquema de la Estrategia experimental general.....	43
Figura 6. Partes del equipo UPLC-TQ-MS/MS.....	48
Figura 7. Metabolitos identificados y metaboloma por muestra de suero.....	55
Figura 8. Clases de metabolitos identificados.....	57
Figura 9. Normalización de la concentración de los metabolitos.....	59
Figura 10. Metabolitos encontrados en el suero de individuos con DC con respecto a SDC (controles).....	61
Figura 11. Metabolitos correlacionados en los grupos DC y SDC.....	62
Figura 12. Concentraciones de metabolitos endógenos DC vs SDC.....	65
Figura 13. Abundancia de metabolitos en los individuos con DC.....	67
Figura 14. Vías metabólicas identificadas en deterioro cognitivo.....	68
Figura 15. Metabolitos alterados en la ruta de la betaína en individuos con DC.....	71
Figura 1A. Gráfico de puntuaciones por pares de los 5 componentes en el sPLSDA.....	86

Abreviaturas

A

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACN	Acetonitrilo

B

BCAA	Ácidos grasos de cadena ramificada
------	------------------------------------

C

COSFAMM	Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad en Adultos Mayores de México
---------	---

D

DCL	Deterioro cognitivo leve
DC	Deterioro cognitivo

E

EA	Enfermedad de Alzheimer
ESI +/-	Ionización por Electrospray (+ positivo y - negativo)

H

HMBD	Base de datos del metaboloma humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSC	Células madres hematopoyéticas

I

<i>Inflammaging</i>	Envejecimiento inflamatorio (de sus siglas en inglés inflammation-aging)
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social

K

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kDa	Kilodaltons

L

LC-MS	Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía Líquida
-------	--

M

MS	Espectrometría de Masas
MoCA	Evaluación cognitiva de Montreal
MS1	Modo de iones precursores
MS2 ó MS/MS	Masas en tándem
MeOH	Metanol
MMSE	Mini-examen del Estado Mental
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
m/z	masa/carga

O

OMS	Organización Mundial de la Salud
-----	----------------------------------

P

PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR +	Reacción en cadena de la polimerasa positivo a COVID-19

Q

QC	Control de Calidad
----	--------------------

R

RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
-----	--

S

SMPDB	Base de datos de vías de moléculas pequeñas (The Small Molecule Pathway Database)
SAM	S-adenosilmetionina
SDC	Sin deterioro cognitivo
sPLSDA	Análisis discriminante de PLS disperso

U

UPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
UPLC-MS/ MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a espectrometría de masas en Tándem
UPLC-TQ	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

1. Resumen.

El envejecimiento representa uno de los factores de riesgo más grandes para el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad (metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas) así como de diversos síndromes geriátrico. En este sentido, el deterioro cognitivo (DC) representa un paso fundamental en las enfermedades asociadas con la neurodegeneración; pues afecta una o más funciones cerebrales como memoria, aprendizaje, concentración y toma de decisiones; lo cual puede afectar las actividades de la vida diaria y, por lo tanto, incrementar la dependencia de cuidadores e instituciones especializadas. Uno de los procesos fundamentales en la salud cerebral es el metabolismo, pues desempeña un papel crucial en la función de los dominios cognitivos. Al comprender los cambios metabólicos asociados al envejecimiento cognitivo, podemos desarrollar nuevas estrategias para prevenir y tratar estas enfermedades debilitantes. En este sentido, la metabolómica permite analizar a detalle en el envejecimiento y el proceso de neurodegeneración asociado a este. Es por lo anterior, que en el presente trabajo, se utilizaron muestras de suero de adultos mayores (>60 años) para realizar un análisis metabolómico comparativo de individuos sin (n=8) y con DC (n=12) para analizar su metaboloma. Como resultados se identificaron 361 metabolitos putativos, de los cuales únicamente 28 mostraron diferencias significativas. Interesantemente, algunos de estos metabolitos están implicados de forma endógena en el DC, por ejemplo, se observó que la betaína, el ácido heptanóico, el ácido mirístico y el ácido litocólico estaban en concentraciones altas en DC mientras que la S-adenosil-L-metionina (SAM) y el ácido tridecanóico estaban en bajas concentraciones. Una vez que realizamos el análisis de enriquecimiento, encontramos que la vía metabólica más alterada por el DC fue el metabolismo de la betaína. Además, también encontramos la Uncarína C como uno de los compuestos con mayor presencia en individuos con DC. Este compuesto se encuentra en la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y tiene uso etnomédico antineuroinflamatorio.

2. Introducción.

2.1 Envejecimiento.

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2030 una de cada seis personas en el mundo tendrá más de 60 años de edad. En México se espera que para el 2050 alrededor del 20% de la población sean adultos mayores de 65 años (World Health Organization, 2015). Con el envejecimiento resultan numerosos cambios a nivel de salud, pues con el incremento de la edad surgen las llamadas “*enfermedades asociadas al envejecimiento*” entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas, cáncer, y los llamados *síndromes geriátricos* como la fragilidad, sarcopenia, incontinencia, dolor crónico, las caídas, entre otras. Es por ello, que resulta fundamental comprender los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la biología del envejecimiento (Panyard, Yu y Snyder, 2022).

El envejecimiento es un proceso complejo que tiene un origen multifactorial en la adaptación biológica evolutiva, pues existen numerosas adaptaciones que alteran la homeostasis a lo largo del tiempo (Rose *et al.*, 2012). Este proceso ha sido definido por la OMS desde un punto de vista biológico como “*el resultado de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, a un mayor riesgo de enfermedad y, en última instancia, a la muerte*” (World Health Organization, 2015).

2.2 Pilares Moleculares del Envejecimiento.

Diversos estudios han demostrado que existen varios mecanismos moleculares en común asociados al envejecimiento, popularmente conocidos como “*Hallmarks of Aging*” o “*Pilares moleculares del envejecimiento*” (López-Otín et al., 2013). A la fecha se han propuesto 12 pilares y se han clasificado a los pilares como “*Primarios*” como aquellos que van acumulando daño con el paso del tiempo (inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis y macroautofagia desactivada). Los “*Antagonistas*” que antagonizan la respuesta al daño (disfunción mitocondrial, senescencia celular y desregulación de censado de nutrientes). Los “*Integrativos*” que surgen por el daño acumulado por los primarios y antagonistas, (el agotamiento de las células madre, alteraciones de la comunicación intercelular, inflamación crónica asociada a la edad también llamado “*inflammaging*” (por el acrónimo en inglés de inflammation-aging) y la disbiosis del microbioma) (Gladyshev et al., 2021; López-Otín et al., 2023) (Figura 1).



Figura 1. Representación gráfica de los doce pilares del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2023). El color azul representa los pilares moleculares primarios que son aquellas que se van acumulando con la edad. El color verde indica el pilar molecular antagonista que representa la respuesta del daño causado por el pilar primario. El color rosa es el pilar integrativo que es la suma del pilar primario y antagonista que causa daños a nivel de tejidos y sistemas en el organismo.

- *Inestabilidad genómica*: La inestabilidad genómica se define como un aumento en la tendencia de presentar mutaciones u otros cambios genéticos en el ácido desoxirribonucleico (ADN), que ocurren durante la división celular y se van acumulando a lo largo del tiempo. Este tipo de daño puede ser por vía endógena, sobre todo en errores en la replicación del ADN, defectos de segregación cromosómica, procesos oxidativos (especies reactivas de oxígeno) y reacciones hidrolíticas espontáneas. La inestabilidad

genómica se acumula en el ADN nuclear, la arquitectura nuclear y el ADN mitocondrial (Gordon *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2022; Sanchez-Contreras y Kennedy, 2022), por lo tanto, puede afectar a los mecanismos de reparación de los tejidos (Blokzijl *et al.*, 2016), lo que favorece el envejecimiento y la susceptibilidad a patologías relacionadas con la edad (Vijg y Dong, 2020).

- *Acortamiento de los telómeros*: Los telómeros son las regiones de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Son secuencias repetitivas de ADN que protegen los extremos de los cromosomas y evitan que se desgasten durante la división celular. Interesantemente, en el proceso de la replicación mitótica, es decir, cada vez que una célula se divide a lo largo del tiempo, sus telómeros se acortan hasta llevarla a la inestabilidad genómica, vías de daño al ADN y finalmente conducir a la senescencia celular (Blackburn, Epel y Lin, 2015).
- *Alteraciones epigenéticas*: Hay modificaciones en el ADN que no cambian la secuencia del ADN, pero sí su actividad (sin alterar dicha secuencia), este tipo de cambios son llamados *epigenéticos* (Holliday, 2006). Entre los cambios epigenéticos se pueden encontrar la metilación del ADN (principalmente en las llamadas islas CpGs), el código de histonas que son cambios postraduccionales de las proteínas histonas, regulación por los ácidos ribonucleicos no codificantes (ncARN), y los cambios conformacionales de las regiones cromosomales en el núcleo (Li, 2021). Con la edad estos mecanismos pierden especificidad generando cambios en la regulación de la expresión génica y otros procesos celulares, que dan como resultado en el desarrollo y progresión de varias patologías humanas relacionadas con la edad, como cáncer, neurodegeneración, síndrome metabólico y enfermedades óseas (López-Otín *et al.*, 2023).

- *Proteostasis*: El funcionamiento de las proteínas es un proceso dinámico que depende de su biogénesis, transporte, plegamiento y degradación. La desregulación de las proteínas comienzan cuando pierden su homeostasis proceso conocido como la proteostasis por la unión de las palabras homeostasis y proteínas. Esto conduce a una acumulación de proteínas mal plegadas, oxidadas, glicosiladas o ubiquitinadas, que con el paso del tiempo forman agregados como cuerpos de inclusión intracelulares o placas amiloides extracelulares (Hipp, Kasturi y Hartl, 2019). El deterioro proteostático contribuye al envejecimiento y varias enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y las cataratas (Hipp, Kasturi y Hartl, 2019).
- *Macroautofagia desactivada*: Es un proceso mediante el cual se engloban elementos citoplasmáticos (organelos principalmente) por una doble membrana (autofagosoma) que se fusiona con un lisosoma donde se degradan (Levine y Kroemer, 2019). El declive de la autofagia relacionado con la edad, incluye pérdida de la función de genes y proteínas que participan en este proceso y se asocia a diversas patologías como lo son el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades metabólicas (Galluzzi y Green, 2019; Nicolás-Ávila *et al.*, 2020).
- *Desregulación de la señalización nutrimental*: La señalización de nutrientes es un proceso complejo que regula el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular. Los nutrientes, como los carbohidratos, las proteínas y las grasas, activan una serie de señales moleculares que provocan que las células activen rutas metabólicas enfocadas en energía y optimización metabólica de nutrientes. Esta red está altamente conservada y responde al modo de nutrición y estímulos como el estrés, activando el anabolismo en

presencia de nutrientes y bajo estrés. Incluso ayuda a activar vías de defensa celular en respuesta al estrés y la escasez de nutrientes (López-Otín *et al.*, 2023). A medida que envejecemos, estos mecanismos comienzan a fallar y demasiada actividad y cambios en la disponibilidad y composición de nutrientes hacen que las células envejezcan más rápido, por ejemplo, una desregulación en la glucosa puede llevar a problemas en los niveles de azúcar en la sangre (López-Otín *et al.*, 2023). Otra desregulación se da en el metabolismo energético por las variaciones ambientales y los niveles excesivos de las especies reactivas de oxígeno, causando la dificultad para utilizar ciertos nutrientes esenciales, lo que podría dar lugar a deficiencias nutricionales y problemas asociados con la edad (Amorim *et al.*, 2022).

- *Disfunción mitocondrial*: las mitocondrias tienen el papel central energético en las células, pero no solo están implicadas en estos procesos, también son responsables de la inflamación que se desencadena por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (López-Otín y Kroemer, 2021). Las mitocondrias son importantes para mantener una salud óptima y su deterioro contribuye al daño durante el envejecimiento, pues son consideradas como las pilas energéticas de las células (López-Otín y Kroemer, 2021; Amorim *et al.*, 2022). Algunos de los cambios que ocurren en estos organelos son: acumulación de daño al ADN mitocondrial, lo cual puede encender señales de inflamación y disminución de la actividad enzimática, lo que reduce la capacidad de las mitocondrias para producir energía (Amorim *et al.*, 2022). *Senescencia celular*: es un proceso celular “natural” que ocurre a medida que las células se replican, pues las células senescentes dejan de dividirse, aunque están metabólicamente siguen activas. La senescencia celular se produce por una serie de factores, como una respuesta compleja al

estrés que afecta la función celular, provocada por daños ambientales como los xenobióticos y por factores celulares intrínsecos, como estrés oxidativo, oncogenes y acumulación de proteínas (Gorgoulis *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2022). Las células senescentes se acumulan en múltiples tejidos y desencadena un fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (por sus siglas en inglés) y que está altamente correlacionado a inflamación crónica asociada a la edad llamada envejecimiento inflamatorio (*inflammaging*) que se asocia con el desarrollo de diversas patologías (Xu *et al.*, 2022).

- *Agotamiento de células madres*: las células madres hematopoyéticas (HSC) tienen la capacidad única de autorrenovarse y mantener su linaje de forma duradera. Las HSC pueden generar múltiples linajes por su capacidad multipotente generando células diferenciadas que continuarán dividiéndose (Clevers y Watt, 2018). De esta forma se pueden ir reparando y manteniendo tejidos, así como los órganos (Clevers y Watt, 2018). La plasticidad inducida por lesiones moleculares y su pérdida progresiva inherentes al envejecimiento de las HSC provoca que se dé un agotamiento en sus capacidades conforme va pasando la edad en los individuos, retrasando la capacidad homeostática de cada tejido (López-Otín *et al.*, 2023).
- *Alteración de la comunicación intercelular*: En el envejecimiento se ven alteraciones progresivas de la comunicación intercelular que comprometen la regulación homeostática y hormonal (Amorim *et al.*, 2022). Haciendo que haya deficiencias en las vías de señalización “*neuro-immuno-endocrinas*” que incluyen los sistemas adrenérgicos, dopaminérgicos y los basados en la ruta insulina/IGF-1 y el eje renina-angiotensina, (Miller *et al.*, 2020; Amorim *et al.*, 2022).

- *Inflamación crónica*: La inflamación crónica asociada al envejecimiento se le ha denominado envejecimiento inflamatorio (López-Otín *et al.*, 2023), consiste en la disregulación de las respuestas a estímulos exógenos y endógenos generados por patógenos, desafíos traumáticos, isquémicos, físicos y químicos, liberando citocinas y quimiocinas tejido específicas que no necesariamente desarrollan por completo la respuesta inmune y que se va acumulando con el paso del tiempo (Tizazu, Mengist y Demeke, 2022; Fulop *et al.*, 2023). Si esta inflamación no se controla puede provocar un mal funcionamiento en los tejidos afectados (Tizazu, Mengist y Demeke, 2022).
- *Disbiosis*: El microbioma ayuda a un mantenimiento de órganos y de la salud del hospedero. La alteración del microbioma, llamada disbiosis, consiste en la alteración de la microbiota en distintas regiones, lo que puede provocar una reducción de la diversidad microbiana, o una alteración de su contenido, por ejemplo, una mayor abundancia de proteobacterias o una alteración en el viroma que puede dar paso al incremento de ciertos tipos de virus (Bidell, Hobbs y Lodise, 2022). Las consecuencias de esta modificaciones pueden producir inflamación crónica asociada a la edad, infecciones concomitantes, trastornos metabólicos, cardiovasculares, neuropsiquiátricos, enfermedad hepática y crecimiento excesivo de bacterias (Zmora, Soffer y Elinav, 2019; López-Otín y Kroemer, 2021; Bidell, Hobbs y Lodise, 2022).

2.3 Metabolómica.

Con los recientes avances en tecnologías y metodologías ómicas hemos sido capaces de generar información molecular a gran escala para analizar poblaciones de una manera rápida y eficaz. Para cubrir todos estos estudios han surgido las llamadas ciencias ómicas enfocadas en el estudio

de la detección de genes (genómica), ARN (transcriptómica), metilación del DNA e histonas (epigenoma), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica) en una muestra biológica en específico (Horgan y Kenny, 2011; Hasin, Seldin y Lusic, 2017) (Figura 2).

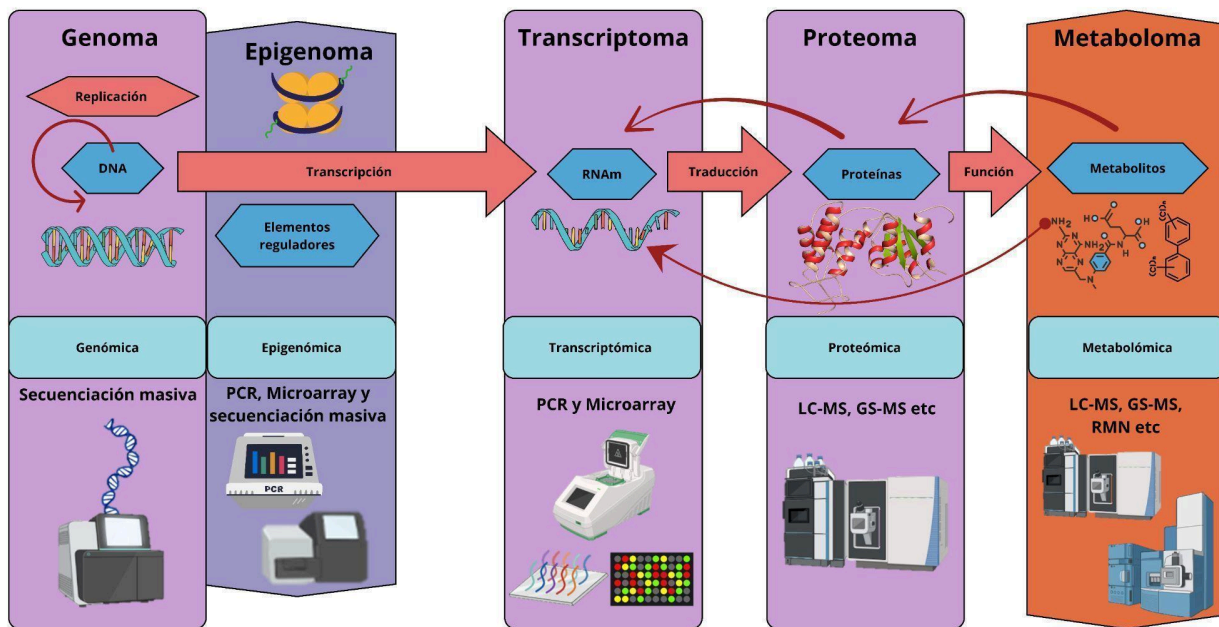


Figura 2. Tecnologías ómicas. En la imagen se puede ver las principales aplicaciones de las diferentes tecnologías que pueden ser implementadas para conocer el funcionamiento celular, esquematizadas desde el punto de vista del dogma central de la biología molecular (Flecha roja). PCR, Microarray. LC-MS, cromatografía de gases acoplado a masas (GS-MS) y RMN.

Las tecnologías ómicas se enfocan en un estudio holístico de las moléculas que componen una célula, un tejido o un organismo y tienen como objetivo principal la detección de biomoléculas en una muestra biológica específica de forma no selectiva y no sesgada, para entender esto como un sistema complejo considerado en su conjunto (Bedia, 2018). Hacer esto exige el uso de tecnologías que permitan analizar de manera masiva muchas muestras que detecten miles de biomoléculas y no solo una o unas cuantas. Dichas tecnologías como la secuenciación masiva o los microarreglos permiten identificar todo el genoma de un organismo (genómica), conocer todo

el conjunto de ARN (transcriptoma); metilación de DNA (metiloma), los RNA no codificantes y las marcas de histonas (epigenoma). Además, surgen tecnologías como la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que nos ayudan a identificar todo un conjunto de proteínas (proteoma) y en su caso todo un conjunto de metabolitos (metaboloma) de un organismo, célula o tejido en particular (Horgan y Kenny, 2011; Hasin, Seldin y Lusa, 2017). Particularmente, el metaboloma es el conjunto de moléculas de bajo peso molecular que se encuentran en un organismo o en una muestra biológica en un momento dado. Los metabolitos son sustancias de bajo peso molecular (<1.5 kDa) que pueden estar compuestos de aminoácidos (aa), azúcares, nucleótidos, lípidos y péptidos (Srivastava, 2019). Estos se ven involucrados en procesos de almacenamiento, utilización de energía, precursores de proteínas, reguladores de la expresión génica, moléculas y en vías de señalización de los diferentes tipos de metabolismo (Klein y Shearer, 2016; Wishart *et al.*, 2022).

El estudio de estos metabolitos en gran escala se conoce como metabolómica y permite conocer en profundidad el fenotipo metabólico de los individuos en respuestas a estímulos externos (ambientales) e internos (procesos fisiológicos e intracelulares). Cabe destacar que la metabolómica no solo permite la identificación de metabolitos individuales, sino también la identificación de patrones de metabolitos que pueden proporcionar información valiosa sobre el estado fisiológico o patológico del organismo. La metabolómica se fundamenta en la identificación, cuantificación y análisis de los metabolitos presentes en una muestra biológica, tales como la sangre, la orina o el tejido, y su conexión con las circunstancias y variables existentes (Nielsen y Jewett, 2007).

Como mencionamos anteriormente, entre los métodos empleados en el estudio de la metabolómica destacan la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectrometría de masas acoplada a cromatografía (HPLC/MS). En la espectrometría de masas, se ionizan las moléculas de una muestra y luego se aceleran en un campo eléctrico. La velocidad de las moléculas ionizadas depende de su relación masa-carga (m/z). Al medir la velocidad de las moléculas, se puede determinar su relación masa-carga. Particularmente en metabolómica la medición de las diferencias en la relación (m/z) entre los metabolitos de la muestra, permite analizar cientos o miles de estos en un solo estudio. Los resultados son una variedad de metabolitos pertenecientes a varias clases químicas y se pueden asociar a diferentes rutas metabólicas. La MS tiene varias aproximaciones y métodos de separación previos a su uso como lo son la cromatografía de gases acoplada a MS (GC-MS), la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a MS (HPLC-MS) y la electroforesis capilar acoplada a MS (CE-MS) (Wishart *et al.*, 2009; Panyard, Yu y Snyder, 2022). En este sentido destaca la Cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) que es una técnica de cromatografía líquida que permite la separación de componentes de mezclas complejas, una vez que el UPLC se acopla a la MS esto permite una separación eficiente de muestras complejas, asociado a una identificación rápida de compuestos contenidos en dichas mezclas.

Por otro lado, el empleo de la RMN en la metabolómica, aunque es menos sensible, cuenta con características únicas y favorables que la hacen beneficiosa, ya que tiene la capacidad de identificar metabolitos desconocidos, debido a que las tecnologías analíticas cada vez son más sensibles al análisis de muestras complejas (Nagana Gowda y Raftery, 2021). La RMN es un fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos para

estudiar moléculas basadas en el espín magnético de los átomos al pasar por un campo magnético (Hornak, 1999). La RMN no es destructiva y se puede usar nuevamente la muestra después de analizarla en el equipo. Además, se tiene la ventaja de que se pueden analizar metabolitos como la glutamina y las coenzimas, las cuales son sensibles a los voltajes de ionización que se usan en el análisis de MS (Nagana Gowda y Raftery, 2021).

Cabe destacar que la metabolómica consiste de dos enfoques, uno que es dirigido y otro llamado no dirigido (Wishart, 2019). La metabolómica no dirigida se centra en la detección de un perfil global de metabolitos no conocidos de una muestra. Esto permite generar hipótesis para detectar biomarcadores y su objetivo es la identificación integral de metabolitos desconocidos o el desarrollo de un análisis general de patrones globales metabólicos desconocidos (Zhang *et al.*, 2016a). Por otro lado, la (Zhang *et al.*, 2016b) metabolómica dirigida permite la cuantificación de metabolitos conocidos en cuestión, ya que este método abarca la medición de grupos de metabolitos caracterizados y validados bioquímicamente en diversas bases de datos como la Human Metabolomic Database una de las bases de datos con mayor referencia utilizada en el mundo (Wishart *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2020). Cabe destacar que la metabólica dirigida es una parte integral en la investigación y el diagnóstico clínico, pues permite la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y trastornos metabólicos (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016). Finalmente, la imagenología de metabolitos es otra rama de la metabolómica dirigida que permite detección y visualización “*in vivo*” e “*in vitro*” de metabolitos en los tejidos (Wishart, 2019).

La metabolómica por MS permite obtener una gran cantidad de datos de los metabolitos contenidos en las muestras. Estos son obtenidos a partir de espectros que se obtiene al ionizar la muestra y separar los iones en función de su relación m/z , estos espectros son los primeros en obtenerse en el equipo por lo que comúnmente se conocen como MS1 (Edmands *et al.*, 2017). Por otro lado, los patrones de fragmentación derivados del ion precursor nos proporcionan la estructura final del compuesto, estos espectros son derivados de los MS1 y se conocen como MS2 (Edmands *et al.*, 2017). Los análisis de MS_n se refieren al uso de MS en tándem lo que genera una fragmentación secuencial de los iones para analizar de forma mas detallada moléculas complejas (Koulman *et al.*, 2009). Estos espectros se pueden obtener a partir de un pico que representa una colección de señales a lo largo de varios escaneos (Smith *et al.*, 2014).

Para el análisis bioinformático del metaboloma, los datos adquiridos de los metabolitos se recopilan en bases de datos como lo son: la base de datos del metaboloma humano (HMDB, del inglés Human Metabolome Database) (Wishart *et al.*, 2009) (<https://hmdb.ca>), la enciclopedia de genes y genoma (KEGG, del inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg>) (Kanehisa and Goto, 2000), MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights>), mapa de lípidos (del inglés LipidMaps, <https://www.lipidmaps.org>) (Haug *et al.*, 2020), la base de datos de metabolitos y entidades químicas (Metlin, del inglés Metabolite and Chemical Entity Database, <https://metlin.scripps.edu>) (Guijas *et al.*, 2018) y la base de datos de metabolitos humanos relacionados con la edad (MetaboAgeDB, del inglés Human Aging-related Metabolome Database) que tiene información sobre cambios metabólicos conocidos asociados con la edad (<https://www.metaboage.info>) (Bucaciuc Mracica *et al.*, 2020). Muchos de los patrones de

espectros se encuentran en estas bases y son necesarios para poder realizar análisis de enriquecimiento que nos den las vías de señalización afectadas. Para los análisis estadísticos previos se utilizan en su gran mayoría modelos lineales generalizados como en las demás tecnologías ómicas.

2.4 Deterioro Cognitivo.

Las funciones cognitivas son los procesos mentales que nos permiten pensar, aprender y recordar, son esenciales para todas las actividades de la vida diaria como comer o leer. Las funciones cognitivas dependen de dominios neurocognitivos los cuales son:

- *Atención compleja*: permite mantener una atención continua, dividida, selectiva y velocidad de procesamiento.
- *La función ejecutiva* ayuda a la planificación, toma de decisiones, memoria de trabajo y flexibilidad mental.
- *Aprendizaje y memoria* permite memoria inmediata, reciente y aprendizaje automático.
- *Lenguaje* que incluye nombrar cosas u objetos, fluidez, gramática, sintaxis y lenguaje receptivo.
- *Habilidades perceptuales motoras* que incluye las habilidades de percepción visual.
- *Cognición Social* se define como la integración de procesos mentales que permiten la interacción entre sujetos, incluyendo fenómenos como la percepción social y la empatía o respuesta afectiva a otros sujetos (American Psychiatric Association, 2013).

El deterioro cognitivo (DC) puede ser desde leve hasta grave, afectando las actividades de la vida diaria y, por lo tanto, la independencia del individuo (American Psychiatric Association, 2013;

Drew, Weiner y Sarnak, 2019). El DC se puede caracterizar como amnésico centrado en la memoria, y el no amnésico, el cual afecta otros dominios como la función ejecutiva (Pérez Palmer, Trejo Ortega y Joshi, 2022). Se puede encontrar como deterioro cognitivo leve (DCL) que muestra una pérdida de capacidades o destrezas cognitivas que no causan un deterioro funcional significativo, o deterioro cognitivo severo (DCS) que muestra una pérdida de múltiples capacidades cognitivas que conducen a deterioro funcional (Albert *et al.*, 2011; Petersen *et al.*, 2018; Pérez Palmer, Trejo Ortega y Joshi, 2022).

El DC puede ser causado por el envejecimiento *per se* (López-Otín *et al.*, 2023), por diversos xenobióticos medioambientales (Garza-Lombó *et al.*, 2019), diversas enfermedades metabólicas (Simó *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020; Al-Akl *et al.*, 2024), accidentes cerebrovasculares (Liu *et al.*, 2015), y la disbiosis (Neuffer *et al.*, 2022). Este puede desencadenar el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas como el EA o diversos tipos de demencias que afectan la memoria (Figura 3).

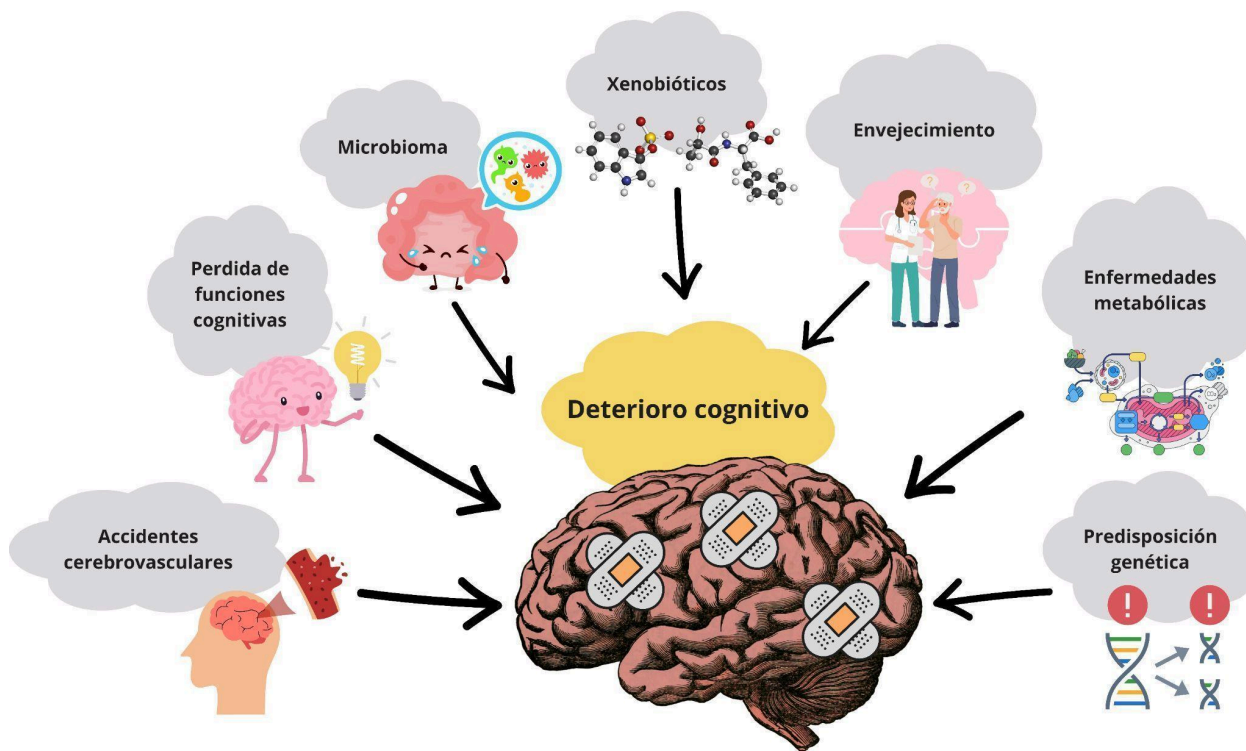


Figura 3. Factores que influyen en el deterioro cognitivo. Las causas más frecuentes que pueden ocasionar DC en los adultos mayores son: pérdida de funciones cognitivas, predisposición genética, enfermedades metabólicas, accidentes cerebrovasculares, microbiota, envejecimiento y xenobióticos.

Para poder diagnosticar el DC y su nivel de avance, se han diseñado estudios de medidas objetivas como son: El MoCA (evaluación cognitiva de Montreal) y el MMSE (Mini-examen del estado mental). La evaluación cognitiva de Montreal (MoCA) cuenta con una alta sensibilidad y especificidad para detectar en etapas tempranas las demencias (Cova *et al.*, 2022). Su diseño consta de una evaluación con una escala de 30 puntos con elementos de evaluación de la función visual espacial/ejecutiva (7 puntos), el lenguaje (6 puntos), la atención/concentración (6 puntos), el retraso en el recuerdo de palabras (5 puntos) y orientación (6 puntos) (Cova *et al.*, 2022). Donde la suma del MoCA $\leq 22/30$ indican la presencia de DC. En la actualidad se han diseñado diferentes modificaciones de dicha evaluación como: el MoCA para sujetos con nivel

bajo educativo o nulo, discapacidad auditiva y audiovisual, MoCA de 5 min que es una versión más corta de la prueba y se aplica por vía telefónica y diversas adaptaciones culturales en distintas poblaciones (Cova *et al.*, 2022). Por otra parte, el ensayo de MMSE, el cual es una breve evaluación del rendimiento cognitivo que deja de lado cuestiones relacionadas con trastornos psiquiátricos o de conducta (Folstein, Folstein y McHugh, 1975; Gallegos *et al.*, 2022), consta de dos partes, la primera analiza las cuestiones relacionadas con la orientación, la memoria y la atención y la segunda evalúa la capacidad verbal y escrita (Gallegos *et al.*, 2022). Es una de las pruebas más utilizadas a nivel internacional para el diagnóstico clínico del DC y se usa principalmente en individuos de edad avanzada, debido a que es fácil de aplicar (Gallegos *et al.*, 2022), usa una escala de medición de 30 puntos, donde el puntaje < 24 con DC y puntaje > 24 , sin deterioro cognitivo (SDC). Esto dependerá de las modificaciones que se realizan en cada país por su nivel de educación y cultura (Villa *et al.*, 2004). Sus desventajas son que hay múltiples versiones, falta de exploración de todos los dominios cognitivos, la falta de derechos de autor, la falta de sensibilidad a variaciones culturales y al nivel escolar de los participantes (Gallegos *et al.*, 2022).

3. Antecedentes Particulares.

3.1 Metaboloma y envejecimiento.

Como se mencionó anteriormente el estudio de la metabolómica es valioso en el proceso de estudio del envejecimiento para analizar los flujos metabólicos que ocurren en el envejecimiento. La gran mayoría de los estudios de metabolómica y envejecimiento se han realizado en muestras

de sangre (completa, suero y plasma) por su disponibilidad y facilidad de obtención (Panyard, Yu y Snyder, 2022), pues cabe destacar que en los adultos mayores no es tan fácil obtener otros tipos muestras. Aunque aún sigue siendo necesario realizar estudios en otras muestras como por ejemplo, líquido cefalorraquídeo (Peters *et al.*, 2020) o en orina para obtener información en el tiempo sobre eventos metabólicos que han ocurrido en todo el organismo asociados a factores dietéticos y de microbioma (Swann *et al.*, 2013) (Figura. 4).

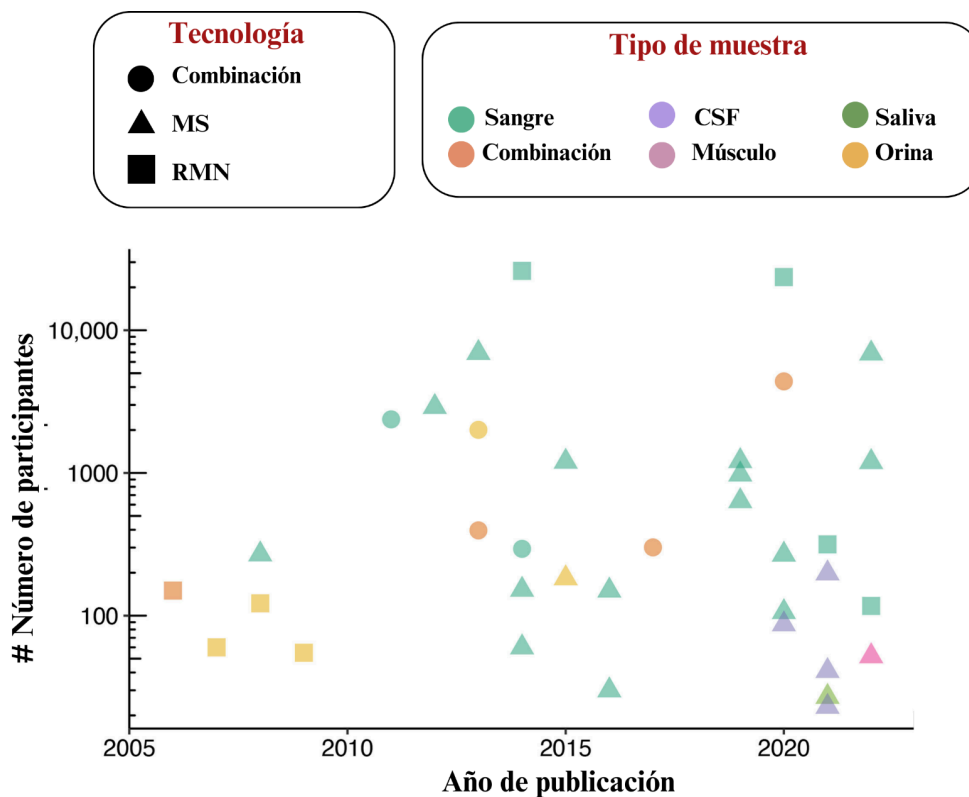


Figura 4. Características de los estudios en metabolómica en adultos mayores de los últimos años. Desde el 2005 el estudio de metabolómica en grandes poblaciones se realizó en RMN, sin embargo, en los últimos años se ha utilizado MS en muestras de sangre en grandes poblaciones. Imagen modificada y tomada de (Panyard, Yu y Snyder, 2022).

Los hallazgos encontrados en estudios de perfiles metabólicos en el envejecimiento destacan cambios en diferentes vías metabólicas, entre las que destacan:

Lípidos y lipoproteínas. El desbalance entre las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), la de baja densidad (LDL) y la de alta densidad (HDL) tienen un papel muy importante en el metabolismo del colesterol, en la enfermedad coronaria, en la isquemia, en la obesidad, en la diabetes tipo 2 y en la enfermedad crónica renal muchas de las cuales son enfermedades asociadas a la edad (Schaefer *et al.*, 1995). Además, se ha visto que los centenarios y los nonagenarios tienen niveles bajos de VLDL, asociándose esto a longevidad principalmente en mujeres (Li, Ren y Li, 2022). Estas moléculas actúan como mensajeros metabólicos y participan en el catabolismo y el balance energético. Particularmente se ha visto que la oxidación de ácidos grasos baja conforme pasa la edad y que la cantidad de ácidos grasos libres en sangre se van acumulando con la edad (Yu *et al.*, 2012). Se ha correlacionado una elevada concentración en plasma de ácidos grasos saturados como ácido palmítico, esteárico, mirístico y nonacosanoico con la edad cronológica y una baja concentración de ácidos grasos no saturados como ácido linoleico, palmitoleico, araquidónico y eicosanopentanoico (Yan *et al.*, 2009).

Hormonas esteroideas. Existe un decremento en las hormonas esteroideas conforme envejecemos, como en el caso de la menopausia o la andropausia, lo cual se ha visto que afecta numerosos procesos fisiológicos y se asocia con fragilidad, cáncer, inflamación, osteoporosis y Enfermedad de Alzheimer (EA) (Panyard, Yu y Snyder, 2022). Particularmente, la hormona dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) se ha propuesto como un predictor de edad metabólica en diferentes estudios (Bunning *et al.*, 2020).

Metabolitos del sistema renal y excreción. El metabolismo de la urea y del correcto funcionamiento renal sufren cambios relacionados con el envejecimiento, en este sentido, los

metabolitos como la ornitina, la óxido-trimetilamina, citrulina, pantotenato y la acetil-arginina, incrementan su concentración conforme envejecemos. Más aún, inclusive se ha visto que la tasa de filtración glomerular se decrementa con la edad y que esto representa un riesgo para enfermedades crónicas del riñón (Macías-Núñez, Stewart Cameron y Oreopoulos, 2007).

Los aminoácidos. En general, los niveles plasmáticos de aminoácidos en sangre cambian de forma variable conforme envejecemos. Por ejemplo, diversos estudios han mencionado que el triptófano, la serina, metionina y la cisteína decremanta sus concentraciones con la edad, mientras que la tirosina incrementa (Panyard, Yu y Snyder, 2022; Legato, 2023). Muchos de estos cambios se creen están asociados inclusive a cambios en el microbioma. Además, se ha demostrado que los cambios en la expresión génica de las enzimas involucradas en la ruta del triptófano pueden afectar la longevidad en diferentes organismos (Babygirija y Lamming, 2021). Algunos autores han propuesto a la metionina como un aminoácido predictor de edad metabólica (Johnson *et al.*, 2019). Algunos cambios en la concentración de aminoácidos en sangre se han visto asociados a enfermedades como sarcopenia, artritis, osteoporosis, y caídas frecuentes (Deschenes, 2004).

Metabolitos de la dieta. Muchos alimentos juegan un papel vital en nuestro metabolismo, en este sentido conforme cambiamos de hábitos alimenticios o adoptamos nuevos modificamos nuestro metaboloma, estos cambios se vinculan a diversas enfermedades asociadas a la edad. Se sabe que la restricción calórica (reducción controlada en la ingesta calórica sin comprometer la nutrición adecuada) tiene efectos benéficos sobre la longevidad, pues ayuda a reducir el estrés oxidativo, la inflamación y la formación de productos de glicación avanzada (Roth y Polotsky,

2012). Por otro lado, en diferentes estudios se ha visto que la ingesta de valina, isoleucina y leucina tiene una relación estrecha con la longevidad e inclusive una correlación positiva en mujeres centenarias (Li, Ren y Li, 2022). De la misma forma, se ha visto que la ingesta de cafeína pudiera tener un mecanismo protector contra la EA, aunque faltan estudios para profundizar bien en los mecanismos (Londzin *et al.*, 2021).

Metabolitos de la inflamación. Existe una gran cantidad de metabolitos asociados a este proceso, como la degradación de purinas y péptidos, la ornitina, la ruta del triptófano, ácido quinurénico o metabolitos provenientes del metabolismo del citocromo CYP450 (Phuoc Long *et al.*, 2022). Además, en centenarios se han visto disminuidos metabolitos como el triptófano, lisofosfolinas, eicosanoides y aumentados metabolitos como la fenilalanina y acetilglicoproteínas (Collino *et al.*, 2013), todos estos se han relacionado con el llamado “*inflammaging*” (Panyard *et al.*, 2022).

Metabolitos del estrés oxidativo. Se ha visto que algunos metabolitos como la 8-dihidroguanosina y 8-oxo-7,8-dihidroguanosina pudieran llegar a reflejar el estatus oxidativo de los individuos (Tsukahara y Kaneko, 2014). Por otro lado, también se ha visto que la concentración de esfingolípidos podría reflejar procesos relacionados con la conversión de esfingomielinas en ceramidas en relación con el estrés oxidativo y la inflamación (Yu *et al.*, 2012).

3.2 Relación entre el deterioro cognitivo (DC) y el metaboloma.

Para entender los mecanismos del DC en el envejecimiento en años recientes se han efectuado diversos estudios de metabolómica y se han enfocado en el deterioro cognitivo leve:

- En residentes >65 años de Shanghai, China donde se identificaron 47 individuos diagnosticados con DCL por el MMSE y un grupo control (n = 47), a los que se les realizó un estudio de metabolómica no dirigida en muestras de suero. Interesantemente, se encontró una disminución de los metabolitos de las fosfatidilcolinas (PC), lisofosfatidilcolinas (LysoPC), fosfatidiletanolaminas (PE), ácidos fosfatídicos (PA) y esfingomielina (SM), esfingosina-1-fosfato (S1P), ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, amidas grasas y aminoácidos; así como un aumento en el ácido 5(S)-hidroxieicosatetraenoico (5S-HETE) (Yinjiao Zhao *et al.*, 2022). Además, se detectó que las vías más desreguladas en DCL eran el metabolismo de los esfingolípidos, la vía de señalización de los esfingolípidos, el metabolismo de la colina y el metabolismo de las purinas. Por otro lado, se identificó que la desregulación del metabolismo de los esfingolípidos puede contribuir a la aparición del DCL (Yinjiao Zhao *et al.*, 2022).
- Por otro lado, en un estudio longitudinal en el cual se utilizaron en combinación metabolómica dirigida y no dirigida realizado en residentes de E.U.A., se realizó un perfil metabolómico en cerebro (n = 109) y suero (n = 566). Se encontró en muestras de cerebro un aumento en los metabolitos como el ácido glicolítico (GLCA), ácido desoxicoláto

(DCA/CA), ácido petroselínico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido palmítico y una disminución en el ácido palmitoleico. Por otro lado, en las muestras de suero se encontraron disminuidos al ácido petroselínico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido palmitoleico; y aumentados el GLCA y el DCA/CA (Wang *et al.*, 2020). Las diferencias de concentración se deben a que las diferencias de los metabolitos séricos no eran tan fuertes como las muestras de cerebro, esto porque la circulación periférica sirve como un depósito descendente de todas las perturbaciones patológicas y, por lo tanto, podría ser más ruidosa que las muestras de cerebro. Las vías alteradas en DCL fueron Biosíntesis del ácido biliar primario (BAs), biosíntesis de ácidos grasos y biosíntesis de ácidos grasos insaturados (FFAs) (Wang *et al.*, 2020).

- Además, otro realizado en Guang Dong Sheng, China, analizó un grupo con DCL amnésico (n = 33) - DCLa (una afección asociada con un riesgo muy alto de EA) y un grupo control de edad avanzada (CE) (n = 41). Se encontró un aumento de α -glucosa, β -glucosa, mioinositol y glicerol; y una disminución de valina, leucina, 1-metilhistidina, aspartato, arginina, glicina, acetato, isobutirato, piruvato, malonato, glutamato, glutamina, lisina y fosfocolina en individuos con DCLa (Yang *et al.*, 2022). Entre las vías alteradas se encontraron aquellas relacionadas con el metabolismo glicólico (glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de la galactosa), el metabolismo de los aa de cadena ramificada (BCAA) (valina, leucina), el metabolismo del aspartato, histidina, glicina y

lisina, el metabolismo de los glicerosfolípidos, el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y el metabolismo de la arginina (Yang *et al.*, 2022).

Por otro lado, los estudios de metabolómica y DC también se han estudiado incluyendo factores y causas de este como: enfermedades metabólicas, accidentes cerebrovasculares y alteración del microbioma:

- En particular en individuos con DM2 y DC se han encontrado diversas vías alteradas relacionadas con el metabolismo de la galactosa y la glucosa, la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, al metabolismo de alanina, aspartato, glutamato y con la degradación de los ácidos grasos (Al-Akl *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2024).
- En estudios con individuos con accidente cerebrovascular de tipo isquémico y DC, se encontró que los metabolitos que cambiaban principalmente eran en particular el triptófano, la glutamina, el glutamato y los aminoácidos de cadena ramificada. Inclusive estos se han propuesto como posibles biomarcadores del DC post-ictus (Deterioro cognitivo después de un accidente cerebrovascular) (Liu *et al.*, 2015).
- Como se mencionó previamente el DC también puede ser detonado después de una cirugía lo que se conoce como disfunción cognitiva posoperatoria (POCD) y que viene acompañada de pérdida de memoria, concentración y comprensión del lenguaje (Qian y Wang, 2020). En este contexto, se ha encontrado que los lípidos, y derivados de la

carnitina eran los metabolitos que más cambiaban en individuos con POCD e inclusive se encontró como un posible biomarcador a la fosfatidilserina (Qian y Wang, 2020).

- Otro de los factores asociado al DC es la ya mencionada disbiosis, la cual tiene importancia en el estudio de la metabolómica dirigida y repercusiones en el desarrollo el DC (Neuffer *et al.*, 2022). En este sentido el microbioma intestinal participa en el metabolismo de los nutrientes y produce metabolitos que participan en el eje intestino-cerebro (Cryan *et al.*, 2019). A la fecha se ha encontrado que el aumento del ácido propiónico producido por las familias de bacterias intestinales *Bacteroidetes spp* y *Firmicutes spp*, tiene una asociación significativa con el DC y la concentración en suero, por cada aumento de 1-DE de ácido propiónico en suero (es decir, aproximadamente 20 µg/L), las probabilidades de deterioro cognitivo aumentaron un 26% y un 40% (Neuffer *et al.*, 2022). El consumo elevado de carne y queso, así como el consumo de alimentos procesados con conservadores y colorantes; en este contexto niveles séricos altos de ácido propiónico se han asociado con mayores probabilidades de DC (Neuffer *et al.*, 2022).

3.3 Estudios de Metabolómica en México

Los estudios de metabolómica en México son pocos y se han enfocado principalmente a estudios de síndrome metabólico en individuos jóvenes o en infecciones por COVID-19. En este sentido uno de los principales estudios es el Proyecto de Exposición Temprana a Tóxicos Ambientales en México (ELEMENT) el cual consistió en un estudio de metabolómica no dirigida en 238 jóvenes con una edad de entre 8 a 14 años de la ciudad de México (Perng *et al.*, 2017). En este estudio se identificaron diversos metabolitos alterados relacionados con el riesgo metabólico como la 1,3-dielaidina, el mioinositol, el urato, la N-acetilglicina, la timina y el ácido dodecanódico. Los resultados mostraron que los niveles altos de tirosina y 5'-metiltioadenosina se asocian a un mayor de riesgo metabólico en hombres. En el enriquecimiento se encontraron alteradas la vía metabólica de lípidos, síntesis de aminoácidos y carbohidratos (Perng *et al.*, 2017). Por otro lado, también existe un estudio de metabolómica dirigida en 122 individuos con COVID-19 para identificar el resultado de las infecciones por en la Unidad de Triage Respiratorio del Hospital General de Zacatecas del IMSS (López-Hernández *et al.*, 2021). El primer panel de grupos control fueron individuos no hospitalizados encontrando los metabolitos relacionados quinurenina, triptófano y ácido pirúvico. El segundo panel comparó los no hospitalizados vs hospitalizados vs intubados y se encontraron alteradas las vías de síntesis de lípidos y el metabolismo glucolítico (López-Hernández *et al.*, 2021).

Por otro lado, en el seguimiento de las cohortes de adultos mayores disponibles en México se han enfocado principalmente en el estudio desde el punto de vista clínico y no desde la metabólica, un ejemplo es el Estudio de Salud y Envejecimiento en México (MHAS, por sus siglas en inglés) que está diseñado para evaluar prospectivamente el impacto de las enfermedades en la salud, la función y la mortalidad de los adultos mayores de 50 años en áreas urbanas y rurales de México (Wong, Michaels-Obregon y Palloni, 2017; Mejia-Arango *et al.*, 2021) y no tiene análisis metabólicos.

Otro estudio interesante es el de la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad de Adultos Mayores Mexicanos (COSFAMM) que es un estudio longitudinal que inició en 2014 en el que participan más de mil personas mayores de 60 años que son derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social de las Delegaciones Norte y Sur de la Ciudad de México. La COSFAMM recolecta datos sociodemográficos (sexo, edad, estado civil, escolaridad, empleo, y vivir solo), historial de comorbilidades (evaluado con el Índice de Comorbilidad de Elixhauser), tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, depresión, DC, variables psicosociales (apoyo social y red social, calidad de vida), baterías estandarizadas para evaluar trastornos del sueño, así como mediciones clínicas objetivas (presión arterial y pulso, funcionamiento físico, bioimpedancia, toma de muestra sanguínea y medidas antropométricas) (Sánchez-García *et al.*, 2017). Interesantemente, la COSFAMM no tienen datos de metabólica, por lo que resulta

interesante realizar un estudio metabolómico exploratorio, para identificar patrones, tendencias y asociaciones de metabolitos que puedan ser relevantes para futuras investigaciones más detalladas del metabolismo de individuos con DC.

Cabe destacar que los estudios de metabolómica en población mexicana son limitados y más aún en la población de adultos mayores. Por lo anterior, en el presente trabajo realizamos un estudio exploratorio de metabolómica en una muestra de adultos de la Ciudad de México procedentes de la COSFAMM, que tiene datos de DC para poder analizar las principales diferencias que existen en metabolitos en individuos con DC y controles sin DC.

4. Hipótesis

En muestras de suero de adultos mayores con DC encontraremos un perfil metabolómico alterado, principalmente en vías metabólicas relacionadas con el metabolismo y síntesis de aa, nucleótidos y lípidos.

5. Justificación

La metabolómica ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para el estudio de las bases fisiológicas del DC. Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios metabolómicos en adultos mayores con DC. Por lo que, en el presente proyecto pretendemos realizar un primer acercamiento mediante un estudio exploratorio de metabolómica, para poder identificar patrones, tendencias y asociaciones de metabolitos que puedan ser relevantes en la población mexicana de adultos mayores para futuras investigaciones dirigidas y con un mayor número de individuos.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general.

Realizar un análisis exploratorio de las alteraciones en el metaboloma de adultos mayores mexicanos con deterioro cognitivo.

6.2 Objetivos particulares.

1. Seleccionar muestras de suero de individuos mayores a 60 años con DC y sanos para realizar el análisis exploratorio del metaboloma.
2. Obtener el metaboloma de muestras de suero de individuos con DC y sanos mayores de 60 años.
3. Identificar los metabolitos diferencialmente alterados en adultos mayores con DC.
4. Identificar las vías metabólicas y de señalización alteradas en adultos mayores con DC.

7. Estrategia Experimental

Metodología Experimental General

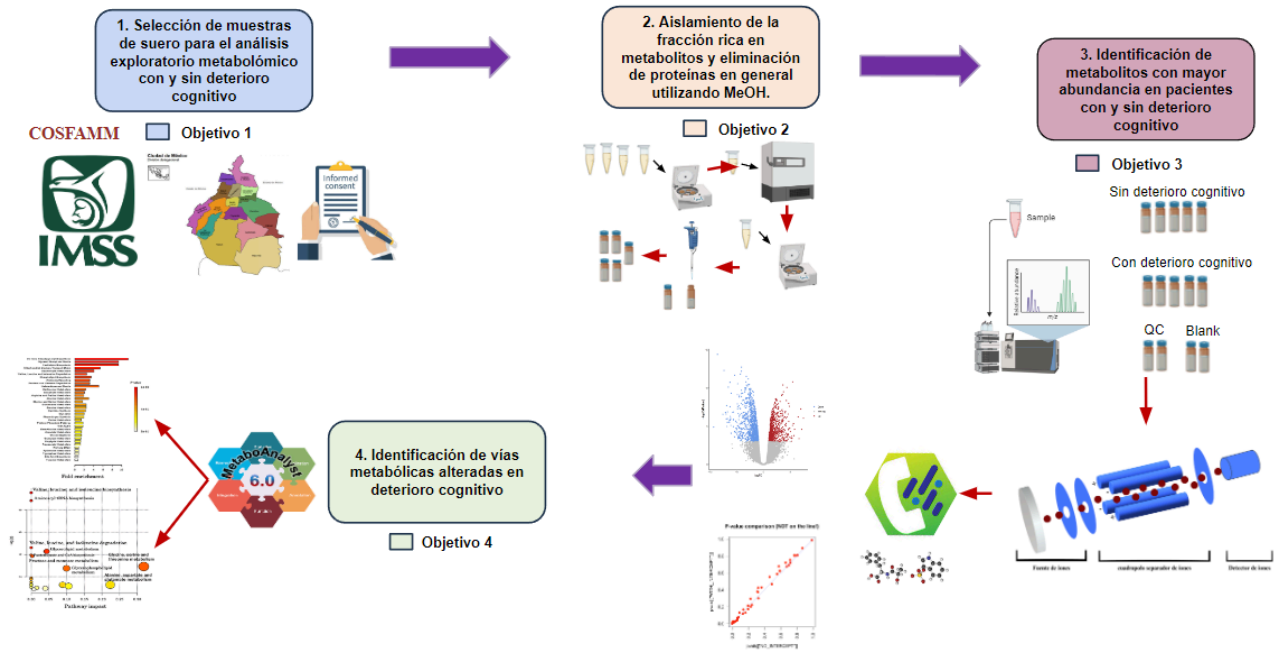


Figura 5. Esquema de la Estrategia experimental. Objetivos a lograr desde la parte experimental y bioinformática.

8. Materiales y métodos

8.1 Selección de muestras de suero en el estudio exploratorio de perfiles de metabolómica.

8.1.1 Muestras de la Cohorte de Obesidad, Sarcopenia y Fragilidad de Adultos Mayores Mexicanos” (COSFAMM)

Al ser un estudio exploratorio se seleccionaron 20 muestras de suero de la cohorte la COSFAMM, ya que se contaba con acceso a muestras de suero del 2017 resguardadas en ultracongelación en el Laboratorio de Biología del Envejecimiento en el Instituto Nacional de Geriátrica. Se escogió la COSFAMM, puesto que es un estudio longitudinal de adultos mayores de 60 años con datos de DC a través del MMSE, sociodemográficos (sexo, edad, estado civil, escolaridad, empleo, y soledad), historial de comorbilidades (evaluado con el Índice de Comorbilidad de Elixhauser), tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, depresión, deterioro cognitivo, variables psicosociales (apoyo social y red social, calidad de vida), baterías estandarizadas para evaluar trastornos del sueño, así como mediciones clínicas objetivas (presión arterial y pulso, funcionamiento físico, bioimpedancia y medidas antropométricas).

Las muestras de suero fueron tomadas de individuos que acudieron a la cita y firmaron un acuerdo de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del IMSS. La toma de sangre se tomó por venopunción usando el tubo rojo Vacutainer, el suero separado del coágulo fue utilizado para el presente estudio. El proyecto fue previamente aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INGER y se encuentran con número de registro: **2020-785-108 (Ver anexo 1)**. Este estudio se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013) y fue aprobado por la Junta de

Revisión de los Comités de Ética, Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de Geriátría (INGER) (número de registro **INP-INGER DI-PI-06/2018**).

8.1.2 Características de las muestras de suero seleccionadas de la COSFAMM.

Se analizó la condición del deterioro cognitivo que fue previamente diagnosticada por personal capacitado utilizando el Mini-examen del estado mental (MMSE) y se seleccionaron de una base de datos que contaba con el puntaje indicado en una escala de 30 puntos MMSE y se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de Inclusión:

- Individuos pertenecientes a la COSFAMM (que hayan firmado el consentimiento informado).
- Mayores de 60 años.
- Que contaron con la evaluación del estudio de MMSE.
- Muestras de suero sin precipitados y correctamente identificadas.

Criterios de exclusión:

- No pertenecientes a la COSFAMM.
- Que no hayan firmado el consentimiento informado.
- Menores de 60 años.
- Sin estudio del diagnóstico MMSE.
- Muestras que sean diferentes al suero, como el plasma y sangre completa y sin identificación.

Para poder identificar el nivel de deterioro cognitivo en los dos grupos DC y SDC se utilizó el MMSE que adoptó y validó Sandra Reyes de Beaman y colaboradores en población mexicana (Villa *et al.*, 2004) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Escala de Mini-examen del estado mental (MMSE). Se utilizó el MMSE en una puntuación de 30 en dos grupos SDC y DC.

Diagnóstico	Puntuación de MMSE
DC	0-26
SDC	27-30

Al ser un estudio exploratorio se utilizó un total de 20 muestras de suero (n = 8 con SDC (control) y n = 12 con DC tomadas en el 2017 dentro del estudio COSFAMM seleccionando el nivel de deterioro cognitivo tomando en cuenta el puntaje MMSE, edad y sexo.

8.2 Identificación y construcción de metabolomas

8.2.1 Obtención de fracciones ricas en metabolitos

Para eliminar las proteínas que interfieren con el estudio del suero se utilizó el solvente MeOH por su capacidad de competir con puentes de hidrógeno con las proteínas permitiendo su separación y precipitación. Brevemente, las muestras de suero fueron descongeladas en hielo a 4 °C, se homogenizó con vórtex por 30 s, se tomaron 200 μ L del suero en un vial de 1.5 mL y se centrifugó a 10,835 g x 10 minutos (centrifuge MiniSpin, Cat: 022620100, lot: I412796M, Eppendorf North America). Finalmente, se tomaron 150 μ L de sobrenadante y se pasaron en un vial de 1.5 mL, dicho sobrenadante se puso en una disolución 1:2 (v/v) con MeOH. Se homogenizó la disolución en vórtex por 30 s (Nagana Gowda y Raftery, 2019; Estrella-Parra *et al.*, 2023). Se incubó a -20 °C x 20 minutos la disolución del sobrenadante y el MeOH. Al salir de la incubación se volvió a centrifugar a 10,835 g x 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (350 μ L), cuidando de no llevarse el precipitado en un vial de 1.5 mL y se repitió la centrifugación e incubación con las características ya indicadas. Finalmente, se colocaron en un inserto de 100 μ L (vial 12 x 32 boca estándar con tripié PP-100pk) posteriormente, se resguardó en hielo seco para su posterior procesamiento en el UPLC-MS/MS.

8.2.2 Separación de metabolitos de baja resolución con cromatografía líquida de alta eficiencia.

Para obtener los metaboloma el procesamiento de las muestras de suero se realizó en el Laboratorio de Farmacología Experimental y Laboratorio de Infectología e Inmunología, ambos ubicados en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, (INPer). Se utilizó la estrategia de metabolómica semi no dirigida adaptada al sistema UPLC-MS/MS que consta de un módulo de cromatografía Acquity UPLC Waters acoplado a un espectrómetro de masas XEVO-TQS Waters con una resolución de masa unidad (FWHM) de 14.6 (unidades de masa).

La estrategia consistió en dos diseños experimentales que se consideran la cromatografía líquida y la parte de la detección de espectrometría de masas (UPLC-MS). La cromatografía líquida usó una fase móvil que utilizó formiato de amonio y acetonitrilo. El formiato interactúa con los grupos amidas dipolares a través de enlaces iónicos ayudando a mantener un pH estable y, por otro lado, el acetonitrilo tiene baja interacción con la fase móvil, lo que permite una separación rápida y reduce la viscosidad de la fase móvil. En la fase estacionaria, se seleccionó una columna BEH amida que cuenta con un ligando de amida trifuncional que al tener un grupo funcional carbonilo (C=O) y un grupo amida (NH₂) le permite retener los compuestos más polares por más tiempo, como lo son moléculas con carbonilos (-C=O), hidroxilos (-OH), aminos (-NH₂) y las interacciones dipolo-dipolo (Liu *et al.*, 2015; Neuffer *et al.*, 2022).

Para la detección de los espectros de los metabolitos separados se utilizó un espectrómetro de masas XEVO-TQS de Waters. El equipo tiene un detector con la tecnología de triple cuadrupolo (TQ), el cual consiste en 4 barras que tienen 2 con cargas positivas y 2 con cargas negativas, para generar un campo magnético variable (Figura. 6). Los iones pasan por los cuadrupolos y producen variaciones en las trayectorias de los iones, que son separados por su carga y masa. La detección de los iones de los metabolitos se realizó utilizando la ionización suave que fue una ionización por electroespray positiva (ESI+).

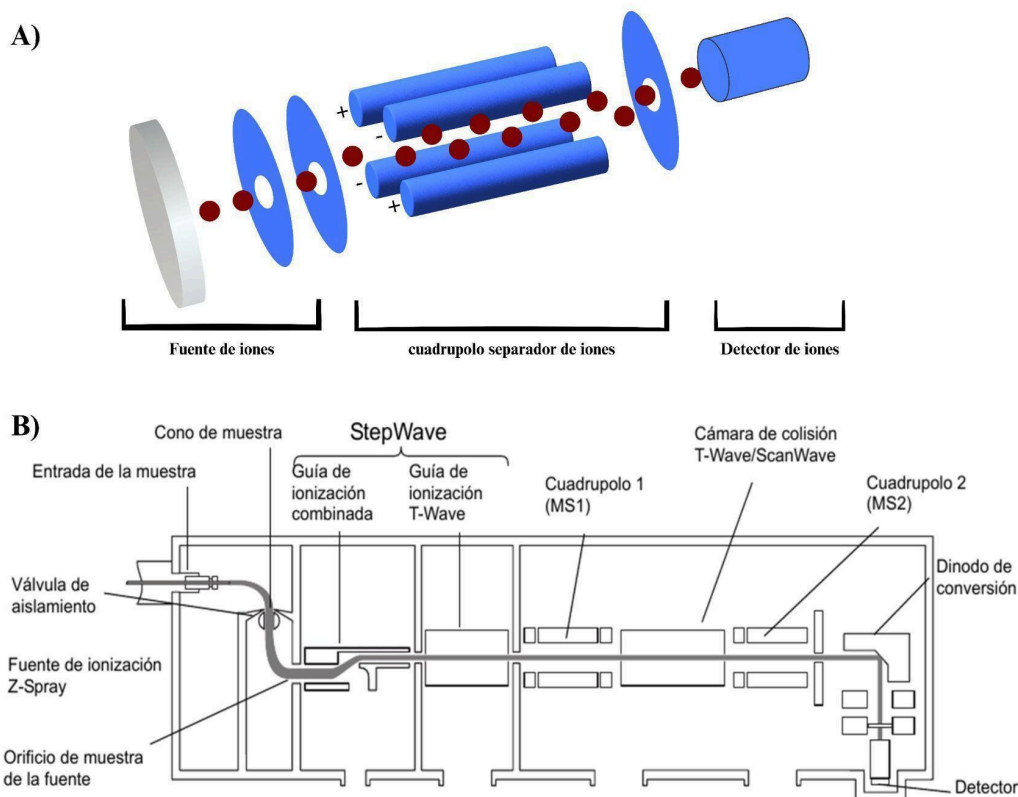


Figura 6. Partes del equipo UPLC-TQ-MS/MS. A) Representación del cuadrupolo. B) Diagrama de los 4 cuadrupolos en el equipo, se puede ver en el primer cuadrupolo (MS1), la cámara de colisión y el segundo cuadrupolo 2 (MS2).

Para el análisis del UPLC se procesó por triplicado el suero, se utilizaron QC (una mezcla de todos los sueros) y como blanco (MeOH y fases móviles) en orden aleatorio inyectando un volumen de 5 μL en el equipo. El cernimiento de detección de masas fue de 50-2000 kDa con un tiempo de análisis de 20 minutos y temperatura de automuestreador de 5 $^{\circ}\text{C}$. En la Fase estacionaria se utilizó la columna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130Å, 1.7 μm , 2.1 mm x 100 mm, (Serial no. 186004801, WATERS) que mantuvo una temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, y contó con lavados un fuerte que fue una mezcla de Isopropanol/MeOH/ACN/H₂O (etiqueta miliQ) (40:30:20:10) y lavado débil una mezcla de 600 μL de una mezcla de H₂O/ACN (50:50). La Fase móvil utilizó una mezcla de formiato de amonio (%A) (10 mM, grado HPLC, catálogo 17843-50G, Lote: BCBP5469V, (≥ 99), Sigma-Aldrich) y acetonitrilo (%B) (ACN, hipergrado LC-MS, LiCrhosolv, Supelco, Lote: I1273629310) con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min, con una condición de elución en gradiente (Tabla 2). Esto permitió la separación de los

metabolitos en el suero, ya que es una mezcla compleja que necesita ser separada para posteriormente sea detectada en masas.

Tabla 2. Separación del suero por gradiente en la columna: Gradiente de separación para los metabolitos en la columna ACQUITY UPLC® BEH Amide 1.7 µm usando el gradiente:

Tiempo (min)	Formiato de amonio (%A)	Acetonitrilo (%B)
0.0	5.0	95.0
4.00	30.0	70.0
5.50	60.0	40.0
8.50	60.0	40.0
10.50	30.0	70.0
15.00	5.0	95.0
20.00	5.0	95.0

Para el análisis de masas e identificar los metabolitos se utilizó el patrón de fragmentación en electrospray positivo (ESI+), utilizando el primer cuadrupolo para la detección de las m/z. Manteniendo la cámara de colisión y el segundo cuadrupolo estático, la adquisición de datos se obtuvo por MS1 en modo centroide. Para los parámetros de MS se utilizaron los siguientes parámetros: Electrospray positivo (ESI+), temperatura de la fuente (150 °C), temperatura de solvatación (350 °C) y flujo del gas de desolvatación: 350 L/Hr. Esto permitió detectar los iones de los metabolitos en ESI+ para su análisis masivo. Utilizamos un enfoque semi-no-dirigido, ya que el inactivar la cámara de colisión y el segundo cuadrupolo baja la resolución, pero no pierde la sensibilidad, esto permite detectar metabolitos putativos de manera no dirigida. Esta metodología recibe el nombre de baja resolución debido a la dificultad de identificar de manera precisa de algunos metabolitos con m/z similares.

8.2.3 Pre-procesamiento de espectros e identificación de metabolitos.

Los equipos de UPLC-MS son sensibles a temperatura, presión atmosférica y esto genera que cuenten con ruido en los espectros y el cromatogramas (Zeng y Bateman, 2023), por lo que es necesario que se pre-procesaran (Chen, Li y Xu, 2022). Se obtuvieron los archivos crudos del equipo utilizando el software MassLynx 4.1. Dichos archivos en formato .RAW se convirtieron a formato .mzML para ser compatibles para MS-DIAL v.4.9.221218 utilizando Proteowizard v.3 (Smith y Zhang, 2023). Los picos se detectaron con mínimo de amplitud de 3000 y una masa de corte de ancho de 0.1 kDa. Para el suavizado de los picos (Smoothing) se utilizó el método llamado Weighted moving y con una masa de detección de 0-2000 kDa.

Para la identificación de los metabolitos se utilizó la base de datos MassBank de Norteamérica adaptada a LC-MS que tiene un total 160,993 espectros, se accedió el 22/04/2024 (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads>). Considerando un umbral de identificación de los metabolitos se utilizaron QC y blancos para eliminar falsos positivos del análisis de los datos en ambos grupos. Se estimó la formación de aductos al momento de la ionización de los metabolitos considerando los solventes de la fase móvil (formiato de amonio y ácido acetonitrilo) y el solvente de precipitación de las proteínas (MeOH) (Thoben *et al.*, 2023). La lista de aductos seleccionados fue la siguiente: $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+CH_3OH+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+ACN+H]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+2Na-H]^+$, $[M+ACN+Na]^+$, $[M+2K-H]^+$, $[M+2ACN+H]^+$, $[M+IsoProp+Na+H]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+NH_4]^+$, $[2M+Na]^+$, $[2M+K]^+$, $[2M+ACN+H]^+$, $[2M+ACN+Na]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+K]^{2+}$, $[M+ACN+2H]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$, $[M+2ACN+2H]^{2+}$, $[M+3ACN+2H]^{2+}$, $[M+2H+Na]^{3+}$, $[M+H+2Na]^{3+}$, $[M+3Na]^{3+}$.

8.2.4 Construcción del metaboloma por alineamiento de los grupos.

Para la construcción del metaboloma de los grupos DC y SDC, se utilizó los controles de calidad (QC) como referencia de detección de metabolitos en MS-DIAL con un factor de tiempo de

retención (0.05 min) y el factor MS1 (0.015) para comparar similitudes de espectros entre las muestras en los dos grupos.

8.3 Identificación de la abundancia de los metabolitos en adultos mayores con deterioro cognitivo.

8.3.1 Normalización de conjunto de metabolomas.

Es importante que se realice una corrección de lote de datos y una imputación en estudios de metabolómica masiva para eliminar interferencias por datos faltantes, para ello se construyó una base de datos que contó con los siguientes elementos: metabolitos, muestras (suero y QC) y concentración (área bajo la curva) (Pang *et al.*, 2024). Usando la guía de la plataforma de MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>). Para las muestras, el método de comprobación de lotes se usó el EigenMS (Karpievitch *et al.*, 2014) y la evaluación se realizó por muestra y QC.

8.3.2 Análisis Estadísticos del Metaboloma de DC y SDC.

Para verificar el comportamiento de los grupos se realizó un análisis multivariante con el paquete R *Omu* (Tiffany y Bäumlér, 2019; Chen, Li y Xu, 2022). Para la identificación de metabolitos implicados y su abundancia en deterioro cognitivo en la plataforma de MetaboAnalyst 6.0. Se realizó el análisis estadístico para la identificación y variación de metabolitos. Así como su diferencia en el grupo DC y SDC se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de un análisis post-hoc BH para un valor $p < 0.05$. Usando los QC para validar los falsos positivos en los metabolitos detectados con BH. Se realizó el análisis discriminante de PLS disperso (sPLSDA) para identificar las concentraciones y sus correlaciones de los metabolitos en DC y SDC de los metabolitos con una $p < 0.05$. Así como un el análisis lineal para la identificación de las abundancias de los metabolitos en DC y se realizó para múltiples covariantes (edad, sexo y grupos) con los siguientes parámetros: concentración, filtrado de datos por QC, la desviación estándar relativa ($RSD = SD/mediana$). Además, de una desviación estándar relativa con un filtrado del 10%.

8.4 Identificación de vías metabólicas alteradas en DC

8.4.1 Análisis de Vías de Señalización y enriquecimiento.

Para identificar las vías que participan en nuestro conjunto de metabolitos se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando la lista de los metabolitos detectados en el análisis estadístico utilizando las bases de datos SMPDB en MetaboAnalyst 6.0.

9. Resultados

Los sueros seleccionados de adultos mayores de la toma de muestra del año 2017 de la COSFAMM, en el estudio exploratorio utilizó un total de 20 muestras de suero (n = 8 con SDC (control) y n = 12 con DC siguiendo los criterios de inclusión como se muestra en la tabla 3. Para su procesamiento en el UPLC-TQ.

Tabla 3. Características de las muestras de suero utilizadas en el estudio. Registro de puntuación de la MMSE, sexo, edad y folio de individuos seleccionadas para el análisis metabólico. Sexo (H = hombre con una n = 12 y M = mujer con una n = 8) y la edad con un rango de 62 a 79 años con un promedio de 70.4 años

Nivel del deterioro cognitivo	Puntaje MMSE	Sexo	Edad
DC (0-26)	8	H	72
	6	M	67
	25	H	68
	23	H	73
	26	H	74
	26	H	82
	26	H	79
	26	M	70

	24	H	75
	26	M	74
	24	H	67
	20	M	69
SDC (27-30)	30	H	65
	27	H	62
	30	H	67
	27	H	77
	30	M	65
	28	M	64
	28	M	64
	29	M	74

Los datos crudos adquiridos del UPLC-TQ por el método semi-no dirigido al realizar el pre-procesamiento, búsqueda e identificación de metabolitos y la construcción del perfil del metaboloma por muestra. El análisis del Pre-procesamiento en MS-DIAL identificó en promedio en DC 312 metabolitos y en SDC el promedio fue de 316 contando metabolitos no identificados en la base de datos y los metabolitos que se identificaron. Se identificaron un promedio aproximado de 31 metabolitos putativos en DC y 32 metabolitos putativos en SDC. Lo que nos brindó una lista completa de metabolitos identificados por MS-DIAL (Figura 7A) y un metaboloma completo por muestra para los dos grupos DC y SDC (Figura 7B).

Figura 7. Metabolitos identificados y metaboloma por muestra de suero. A) Los metabolitos identificados se obtuvieron por tiempo de retención, m/z, comparación de datos con iones precursores, su formación de aductos en la base de datos de MassBank Mona. B) MS-DIAL nos muestran los metabolitos identificados en su totalidad en cada muestra donde el eje Y se observa los m/z de cada metabolito y el eje X nos muestra el ion precursor detectado en un periodo de tiempo.

Se realizó una búsqueda de los metabolitos en las bases de datos de MassBank Mona, PubChem, KEGG, HMDB con la ayuda de MBROLE3 y Fiehn lab (<http://cts.fiehnlab.ucdavis.edu/>) utilizando los InChIKey que nos brindó MS-DIAL. Las limitaciones que nos encontramos al hacer esto es la pérdida de información de muchos metabolitos que aún no se han anotado en KEGG y HBMD, de todo nuestro conjunto completo de metabolitos (2721) detectados en el estudio se identificaron 321 metabolitos anotados (321 registros en KEGG y solamente de estos había 238 de HMDB). Además, estos metabolitos detectados pertenecen de manera general a antibióticos, carbohidratos, hormonas, transmisores, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, péptidos, vitaminas, compuestos fitoquímicos y otros (Figura. 8).

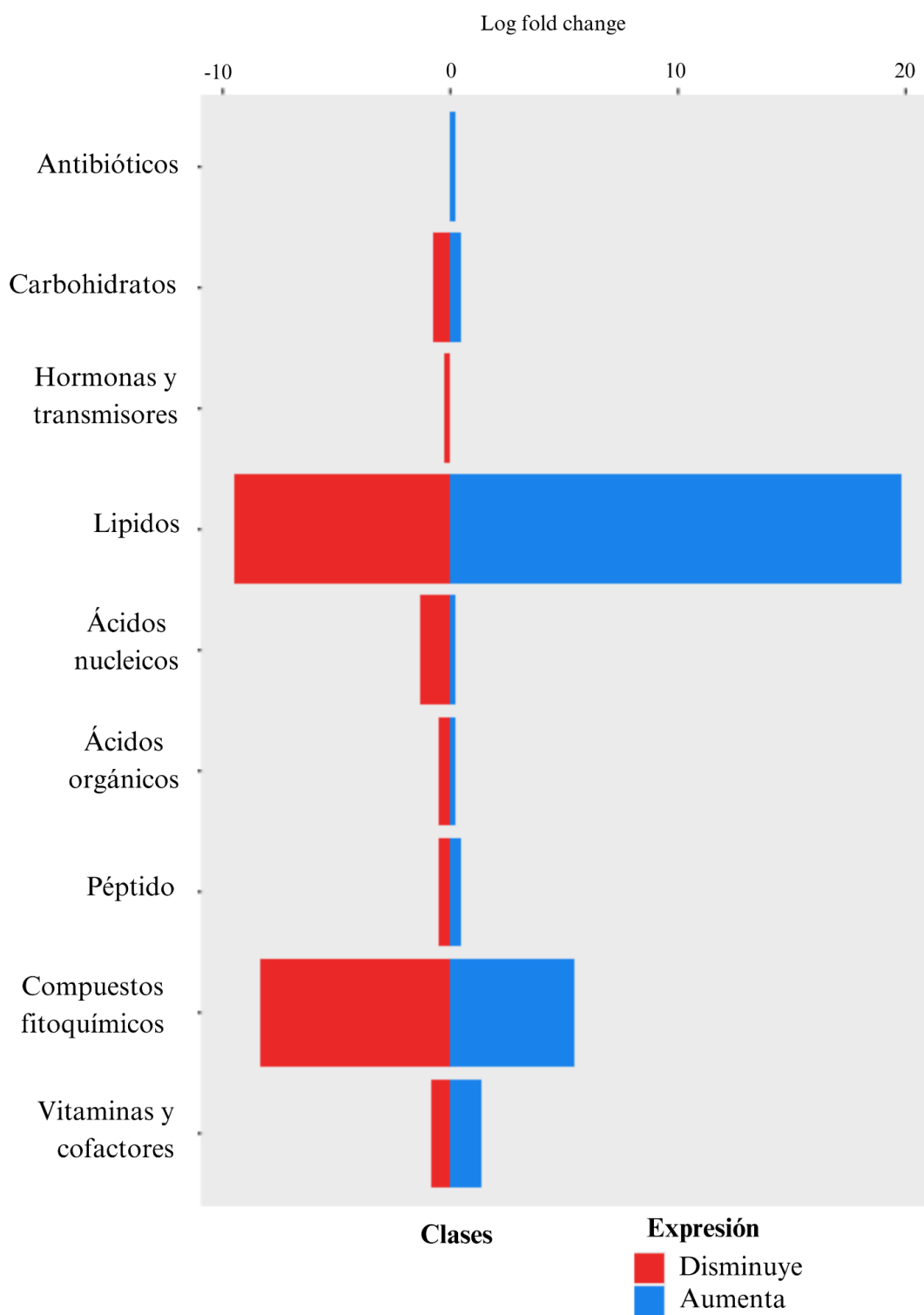
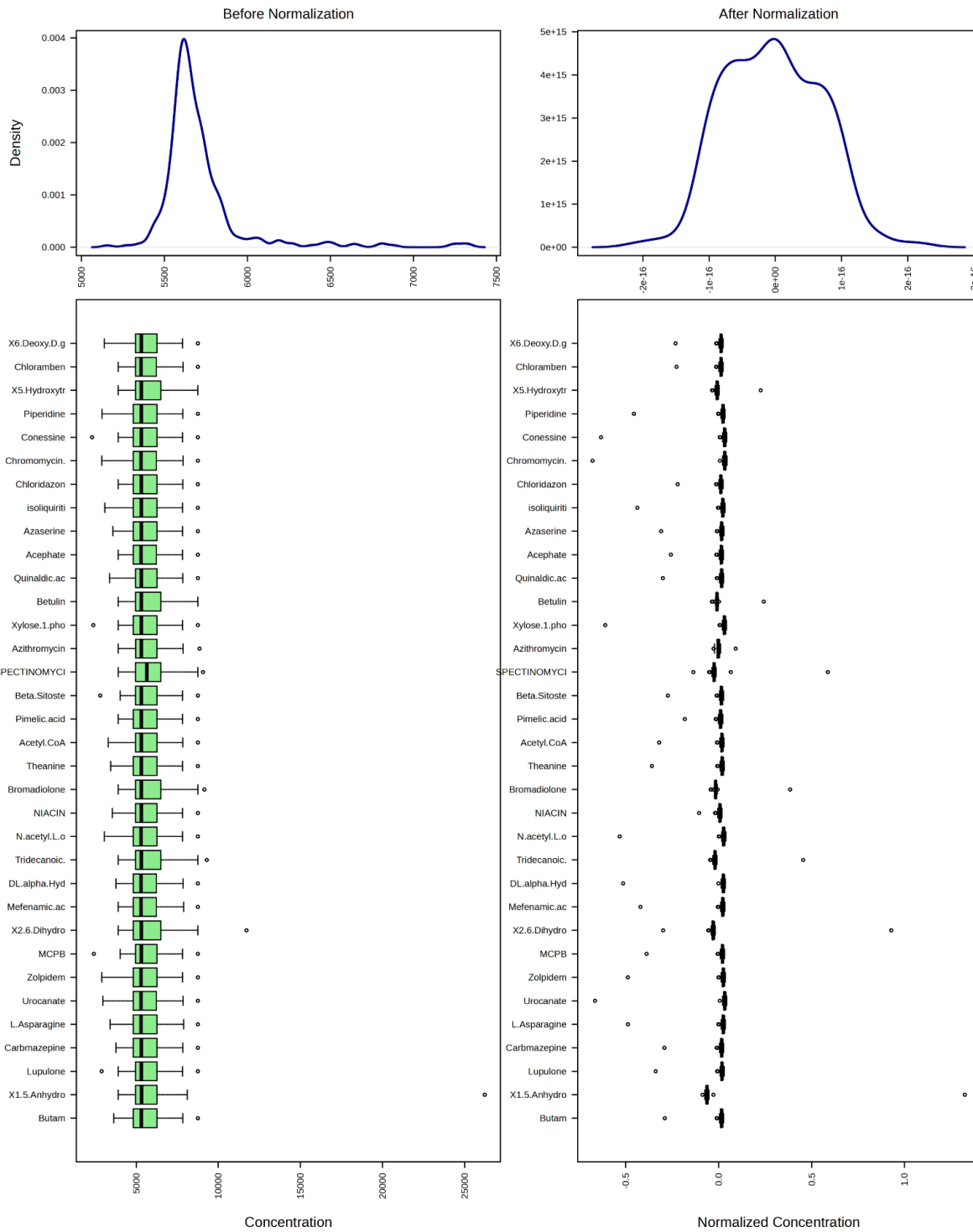


Figura 8. Clases de metabolitos identificados. Gráficos de barras de los recuentos de metabolitos. Se pueden observar en el eje de la Y las categorías de los metabolitos detectados en el suero en nuestros dos

grupos. Por otro lado, en el eje de la X se puede observar el fold change (veces de cambio) en el conteo de cada metabolito en las muestras de los dos grupos.

Lo anterior se realizó para la construcción de una base de datos para poder comparar los dos grupos de estudio. Era necesario antes una corrección por lotes en los grupos por metabolito y por muestras, esto nos permitió eliminar datos faltantes e incluso posibles datos no relevantes de metabolitos que nos afectarán en posibles análisis posteriores como se muestra en la Figura 9.

A)



B)

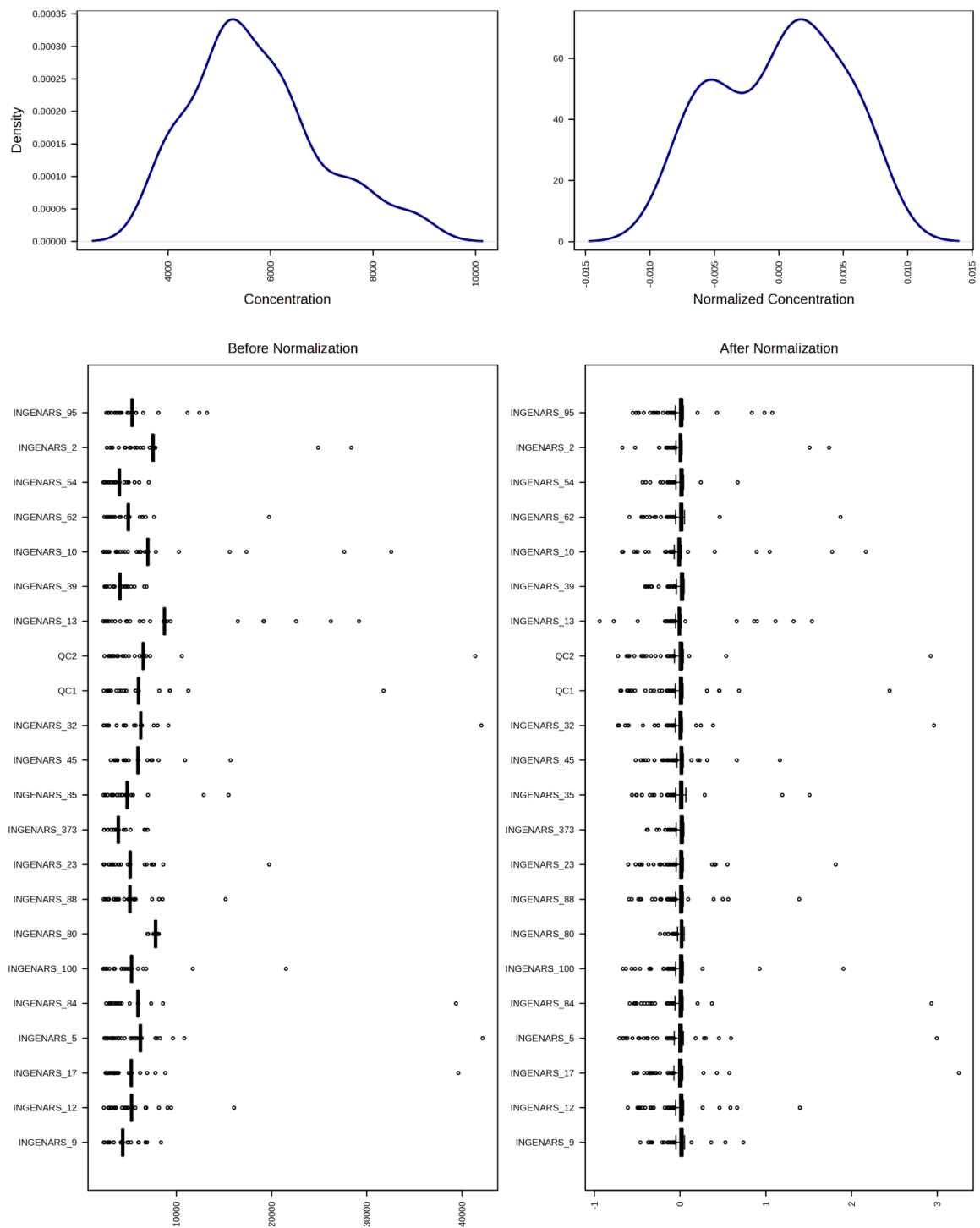


Figura 9. Normalización de la concentración de los metabolitos. Se realizó una corrección por lotes y normalización de los datos como se observa en la gráfica a los grupos tomando en cuenta las muestras de

los sueros que incluyo también los metabolitos detectados en cada muestra por su área para identificar la abundancia donde se muestra él antes y después de la corrección por el área para la concentración donde (9A) es el grupo de metabolitos y (9B) por grupo de muestras.

A través de un análisis de ANOVA de una vía se identificaron 28 metabolitos relevantes entre los grupos DC y SDC, con diferencias significativas en sus abundancias ($p < 0.05$). Utilizando un modelo lineal generalizado, se determinaron los metabolitos más y menos abundantes en cada grupo, como se muestra en la Figura 10.

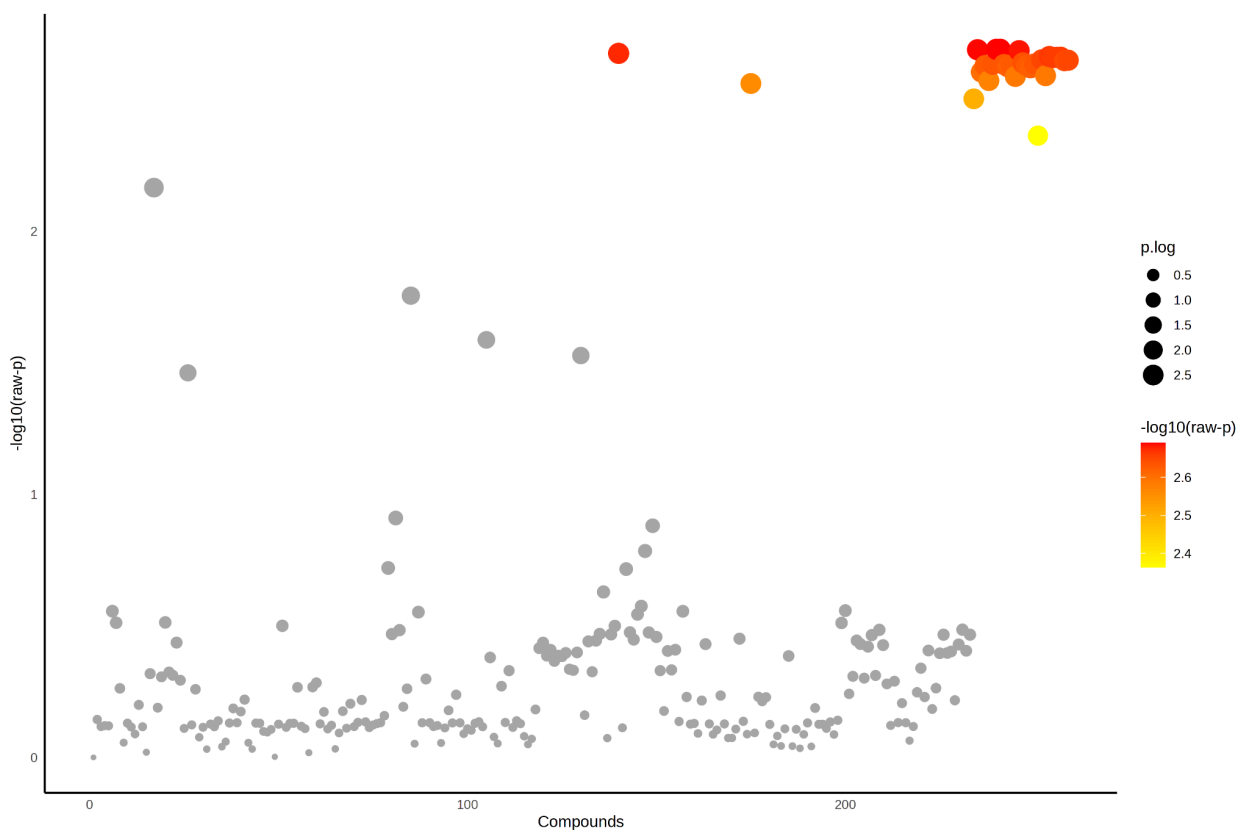


Figura 10. Metabolitos encontrados en el suero de individuos con DC con respecto a SDC (controles). En la figura se muestran los metabolitos detectados ($n=28$). El tamaño del círculo nos indica la significancia del p-valor de 0 a 2.6 y en la escala de amarillo a rojo son todos aquellos metabolitos con valores de $p < 0.0025$.

Los metabolitos analizados en los estudios ANOVA test y el modelo lineal generalizado se realizó un sPLSDA que mostró la correlación de los metabolitos basados dos grupos DC y SDC comparando con el QC. En la Figura 11A se observan los datos de DC que van al PC1 y los

metabolitos de SDC se van hacia el PC2 mostrando separación entre los dos grupos. Los metabolitos que se detectaron más correlacionados en los grupos separados por sus cargas para ver la correlación de los metabolitos con DC y SDC (Figura. 11B).

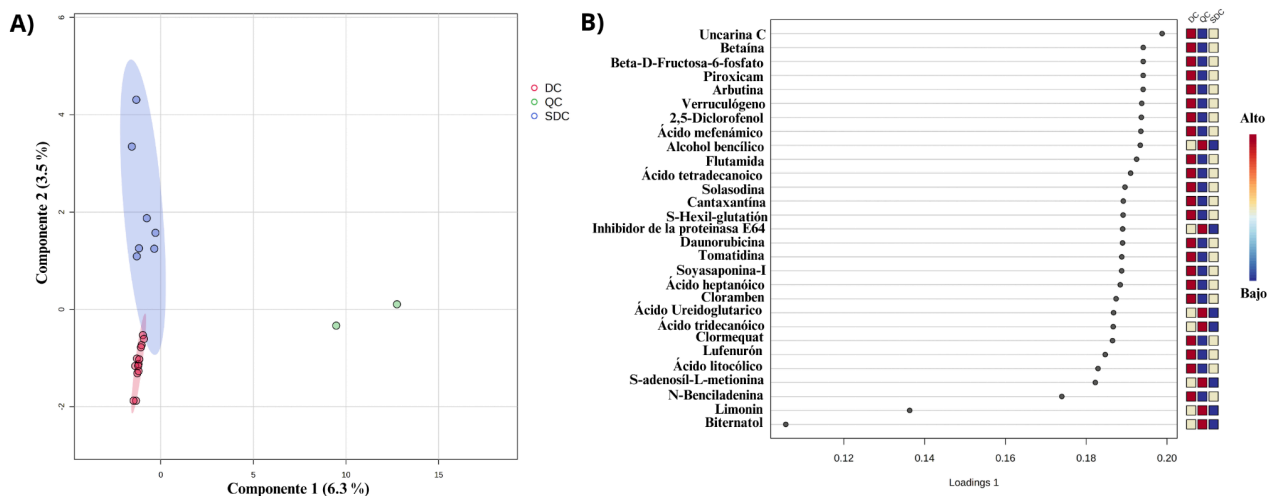


Figura 11. Metabolitos correlacionados en los grupos DC y SDC. A) Los resultados del (sPLSDA) encontraron diferencias entre grupos de muestras DC y SDC. Permitió la visualización, comprensión de los metabolitos y su contribución a la separación en DC y SDC. B) En el eje de las Y se puede observar la concentración de los metabolitos que se clasifican con mayor concentración en color rojo y menor concentración en color azul, esto se valida con los metabolitos que se encuentran en el QC. El eje de las X nos muestra las proyecciones de los metabolitos en un uso de combinación lineal de las concentraciones originales que maximiza la separación entre los grupos. Esto permite comparar los valores de un metabolito en diferentes grupos, es decir un metabolito tiene un valor mucho más alto en un grupo que en otro, permitiendo observar metabolitos diferencialmente expresados entre los grupos.

Los metabolitos encontrados se buscaron en la base de datos de KEGG en humanos para identificar qué vías se habían alterado. Se encontraron: al ácido tetradecanoico, β -D-Fructosa-6-fosfato, betaína, arbutina, ácido litocólico, ácido carginolico, ácido tridecanoico, S-adenosil-L-metionina (SAM), ácido heptanóico, entre otros metabolitos en los dos grupos. Muchos de los metabolitos encontrados están relacionados con pesticidas y en KEGG son detectados como herbicidas e insecticidas, así como metabolitos secundarios de los alimentos (fitoquímicos) que consumen los individuos. Los metabolitos de medicamentos que se encontraron son en su mayoría antiinflamatorios (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen del perfil metabólico de individuos con DC. La tabla muestra los metabolitos definidos en la base de datos KEGG y la clasificación que le da el paquete de R-Omu.

Clases de metabolitos	Metabolitos putativos	KEGG
Endógenos	β-D-Fructosa-6-fosfato	C05345
	Betaína	C00719
	Ácido heptanoico	C17714
	Ácido tetradecanoico	C06424
	Arbutina	C06186
	Ácido litocólico	C03990
	S-adenosil-L-metionina	C00019
	Ácido tridecanoico	C17076
	Ácido Ureidoglutarico	C05829
Compuestos fitoquímicos	Uncarina C	C17595
	Arbutina	C06186
	Tomatidina	C10826
	Soyasaponina I	C08983
	Solasodina	C10822
	Betaína	C00719
	Cantaxantina	C08583
	Limonin	C03514
Fármacos (Antiinflamatorio, Antineoplásicos y Antiandrógenos)	Piroxicam	C01608
	Ácido mefenámico	C02168
	S-Hexilglutación	C02886
	Daunorrubicina	C01907

	Flutamida	C07653
	Inhibido de Proteasas E-64	C01341
	Alcohol bencílico	C00556
	Bitertanol	C06853
Pesticidas (Herbicidas e Insecticidas)	Chlormequat	C18585
	Lufenuron	C18434
	Chloramben	C19056
	N-Benziladenina	C11263
Micotoxina	Verruculógono (Khoufache <i>et al.</i> , 2007)	C20045
Xenobiótico	2-5-Diclorofenol (Park and Kim, 2018)	C06602

Se identificaron los metabolitos endógenos y se revisó las concentraciones originales entre los dos grupos DC y SDC, comparándolos con los QC usando gráficas de BoxPlot entre los grupos de los metabolitos endógenos de los resultados del ANOVA ($p < 0.05$). Los metabolitos aumentados en DC comparados con SDC que fueron β -D-Fructosa-6-fosfato, betaína, ácido heptanoico, ácido mirístico (ácido tetradecanoico), arbutina, ácido litocólico, S-adenosil-L-metionina, ácido tridecanoico y ácido Ureidoglutárico (Figura. 12).

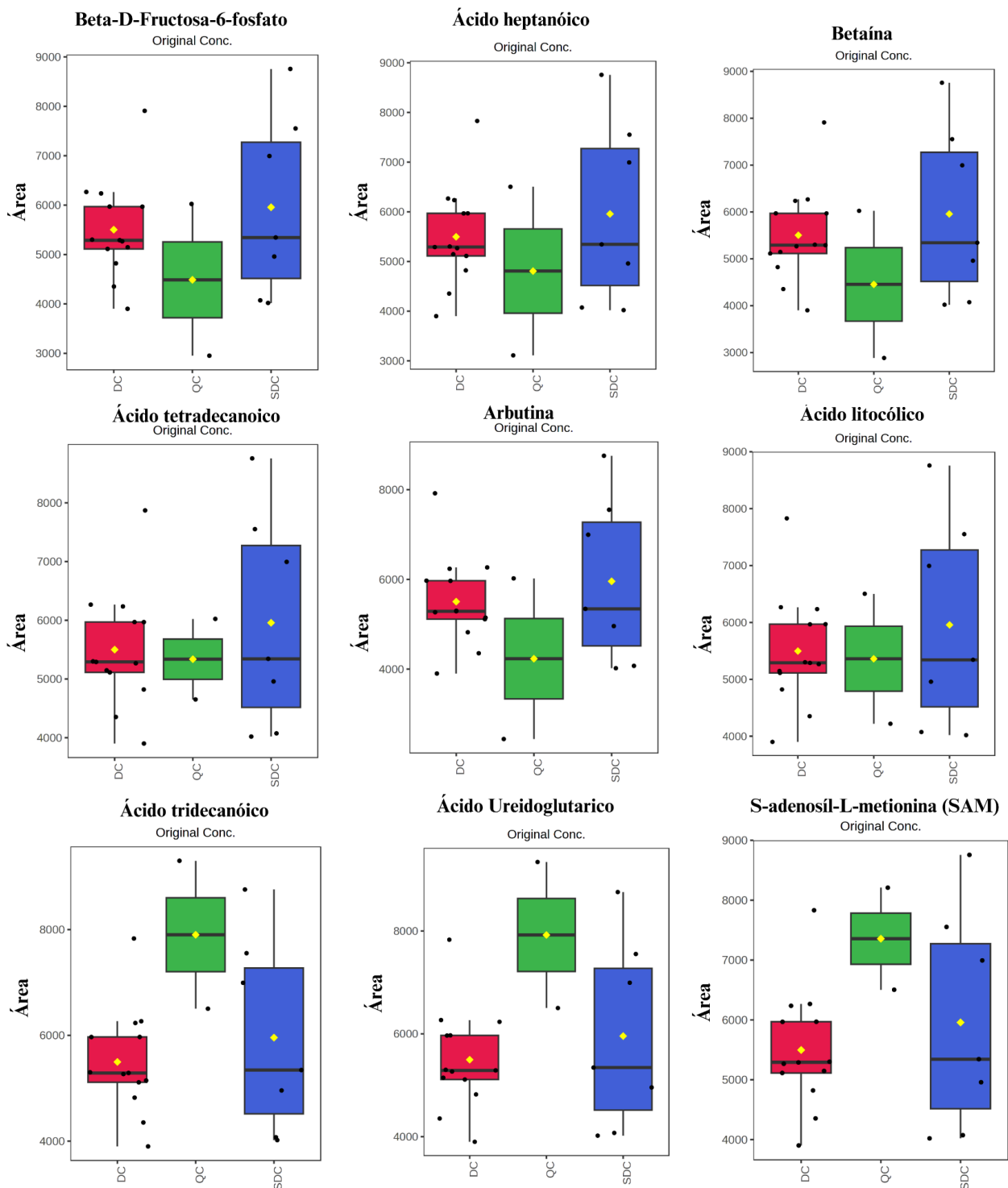
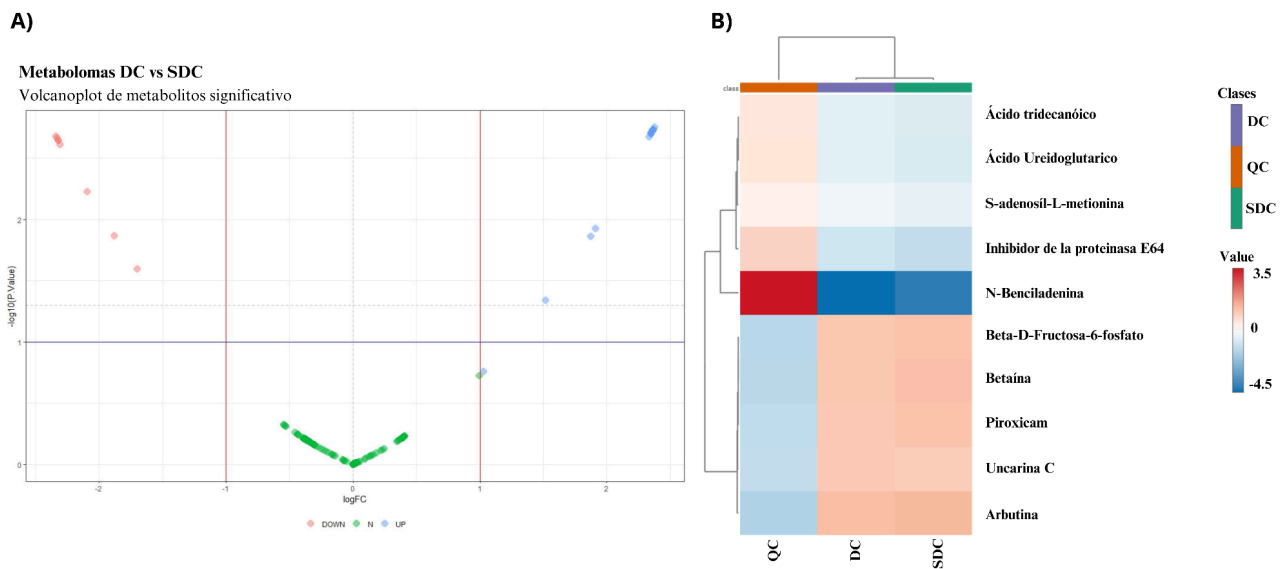


Figura 12. Concentraciones de metabolitos endógenos DC vs SDC. Se observan las gráficas BoxPlot que muestran las concentraciones originales detectadas entre los dos grupos. El eje de las Y muestra el área detectada en el UPLC-TQ y el eje de las X nos muestra la concentración por grupo que incluyen el QC

Las concentraciones fueron normalizadas por corrección de lotes para eliminar posibles sesgos provocados de las concentraciones entre los grupos para detectar las abundancias de los metabolitos entre los dos grupos realizando un volcano plot (Figura. 13A), para analizar las diferencias en las abundancias de los metabolitos en DC y SDC (Figura. 13C). Se realizó heatmaps para identificar los patrones del aumento o disminución de los metabolitos entre los dos grupos de los metabolitos endógenos detectados con ANOVA y Modelo lineal generalizado ($p < 0.05$) (Figura. 13B).



C)

Incrementados ↑		Disminuidos ↓
Uncarina C	Daunorubicina	Inhibidor de la proteinasa E64
Arbutina	Ácido heptanoico	Ácido caglúmico
Betaina	Ácido tetradecanoico	Ácido tridecanoico
beta-D-Fructosa 6-fosfato	Chlormequat	S-adenosil-L-metionina
Piroxicam	Lufenuron	Alcohol bencilico
Verruculógeno	Chloramben	Biternatol
2,5-Diclorofenol	Ácido litocólico	Limonin
Ácido mefenámico	N-Benciladenina	
Solasodina	Tomatidina	
Cantaxantina	Soyasaponina I	
S-Hexil-glutatión	Daunorubicina	
Flutamida		

Figura 13. Abundancia de metabolitos en los individuos con DC. Los metabolitos identificados en el volcano plot (A) nos indica cuáles son más abundantes en color azul (C), y cuáles menos abundantes en rojo (C) al comparar entre DC y SDC. B) el heatmap muestra en las filas las intensidades de los metabolitos en ambos grupos, Donde se observa con mayor intensidad a metabolitos endógenos como la betaína, β -D-Fructosa-6-fosfato, comprando los grupos con el QC nos muestra que ambos grupos difieren en intensidades entre los metabolitos detectados como se muestra en la líneas.

A los metabolitos alterados en DC se les realizó un análisis de enriquecimiento y de señalización para identificar las vías alteradas en DC. Los resultados se pueden ver en la (Figura 14A y B). Los metabolitos más importantes en esta vía son la Betaína y SAM, ya que estos metabolitos se encontraron en muchas vías asociadas a metabolismo de aa como el metabolismo de metionina, metilhistidina, glicina y serina; y biosíntesis de la fosfatidilcolina.



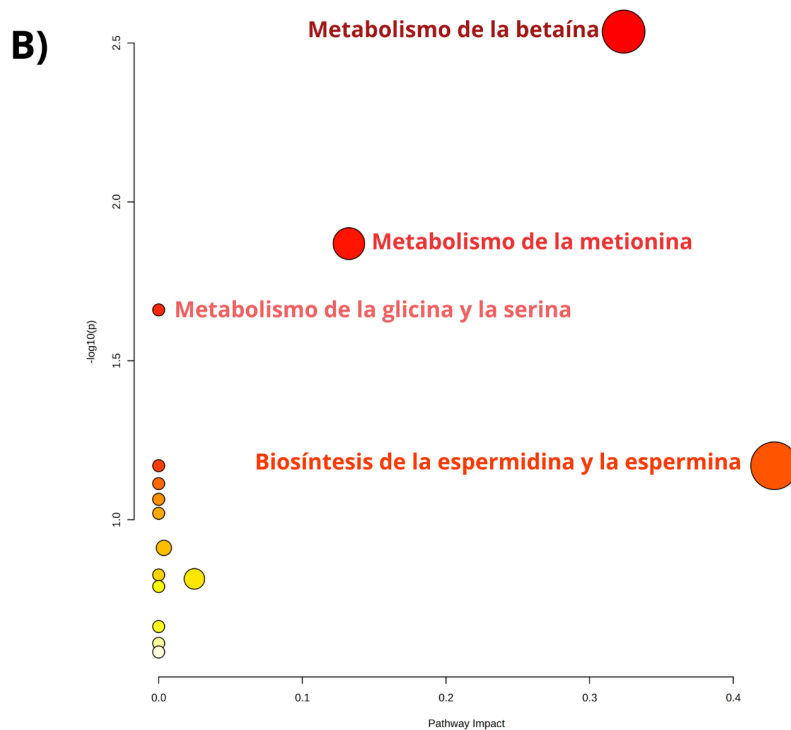


Figura 14. Vías metabólicas identificadas en deterioro cognitivo. A) Análisis de enriquecimiento de vía con mayor impacto por los metabolitos (pathway impact) B) Análisis de vías significativas (Enrichment ratio). Se puede observar en la figura 1A las vías más relevantes detectadas del conjunto de metabolitos detectados en los grupos muestran la conexión de los dos metabolitos que son la betaína y SAM que son metabolitos que regulan el metabolismo de los aminoácidos y lípidos. Esto se confirma con el análisis de enriquecimiento 1B donde se observa que el metabolismo de la betaína es uno de los más alterados en el DC.

10. Discusión

En el presente proyecto se realizó un análisis exploratorio del metaboloma del suero de individuos con DC y SDC. Para efectuar este análisis primero se diseñó un método de análisis metabolómico de baja resolución semi no-dirigido. Este método consistió en adaptar un equipo de metabolómica dirigida (UPLC-TQ-MS/MS) para realizar metabolómica no dirigida, para detectar iones precursores y su concentración en las muestras de suero. Es importante destacar que al realizar el análisis de ionización con un solo cuadrupolo la resolución y fragmentación de los iones precursores es baja, por lo que se obtienen metabolitos putativos que es necesario

validar manualmente con bases de datos que registren dichos iones precursores, de ahí su nombre de semi-no dirigido y de baja resolución.

Como resultados del metaboloma se encontró que dentro de las vías alteradas más enriquecidas estaban la vía de la metilhistidina, la betaína y la metionina (Fig 10-14). La primer vía se ha relacionado con DC, pues se han detectado niveles bajos de 1-metihistidina afectando el metabolismo de los aa de cadena ramificada (BCAA), y se sabe que estos aa son intermediarios metabólicos en la neurodegeneración, función de neurotransmisores, síntesis de proteínas y estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2022). Por otro lado, la vía del metabolismo de la betaína participa en mecanismos a nivel molecular como: metabolismo de lípidos, de la glucosa, transcripción de genes inflamatorios y metabolismo de los aminoácidos azufrados (Zhao *et al.*, 2018; Mihara *et al.*, 2022). La principal función de la betaína en el sistema nervioso central es la protección contra la excitotoxicidad causada por el retículo endoplásmico que lleva a problemas de sobreestimulación de los receptores de glutamato (Zhao *et al.*, 2018). Inclusive la homocisteína que también está involucrada en esta vía induce estrés oxidativo y apoptosis en el sistema nervioso central y su acumulación puede producir daño neuronal y DC (Zhao *et al.*, 2018). Además, la colina que es un precursor de la betaina también se ha relacionado con DCL y su metabolismo es muy importante en la producción de betaina a nivel mitocondrial (Y. Zhao, Song, *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022).

Nuestros resultados sugieren una relación estrecha entre el metabolismo de la betaína y la metionina, pues ambas vías se encontraron alteradas en pacientes con DC (Figuras 10-14). La betaína, a través de su contribución a la homeostasis de la metionina, influye indirectamente en el proceso de metilación (Yan Zhao *et al.*, 2022). Además, la metionina sirve como sustrato para la metionina adenosiltransferasa (MAT) en la síntesis de (SAM), y este participa como donante universal de grupos metilo en numerosas reacciones de metilación asociadas con neurotransmisores (Yan Zhao *et al.*, 2022). Sin embargo, los niveles altos de betaína encontrados en las muestras de individuos con DC no sugieren que esta venga del metabolismo de la betaina a nivel mitocondrial, ya que encontramos un nivel de SAM disminuido en DC (Zhao *et al.*, 2018; Mihara *et al.*, 2022) y, al analizar a detalle esta vía hacen falta precursores que sustenten su metabolización mitocondrial (Figura 15). La falta de la detección de estos metabolitos

probablemente se deba al limitado número de muestras de suero analizadas en este estudio exploratorio. Así como al hecho de que nuestro estudio sea no dirigido, puesto que no contábamos con un set de metabolitos ya conocidos asociados con DC en población mexicana.

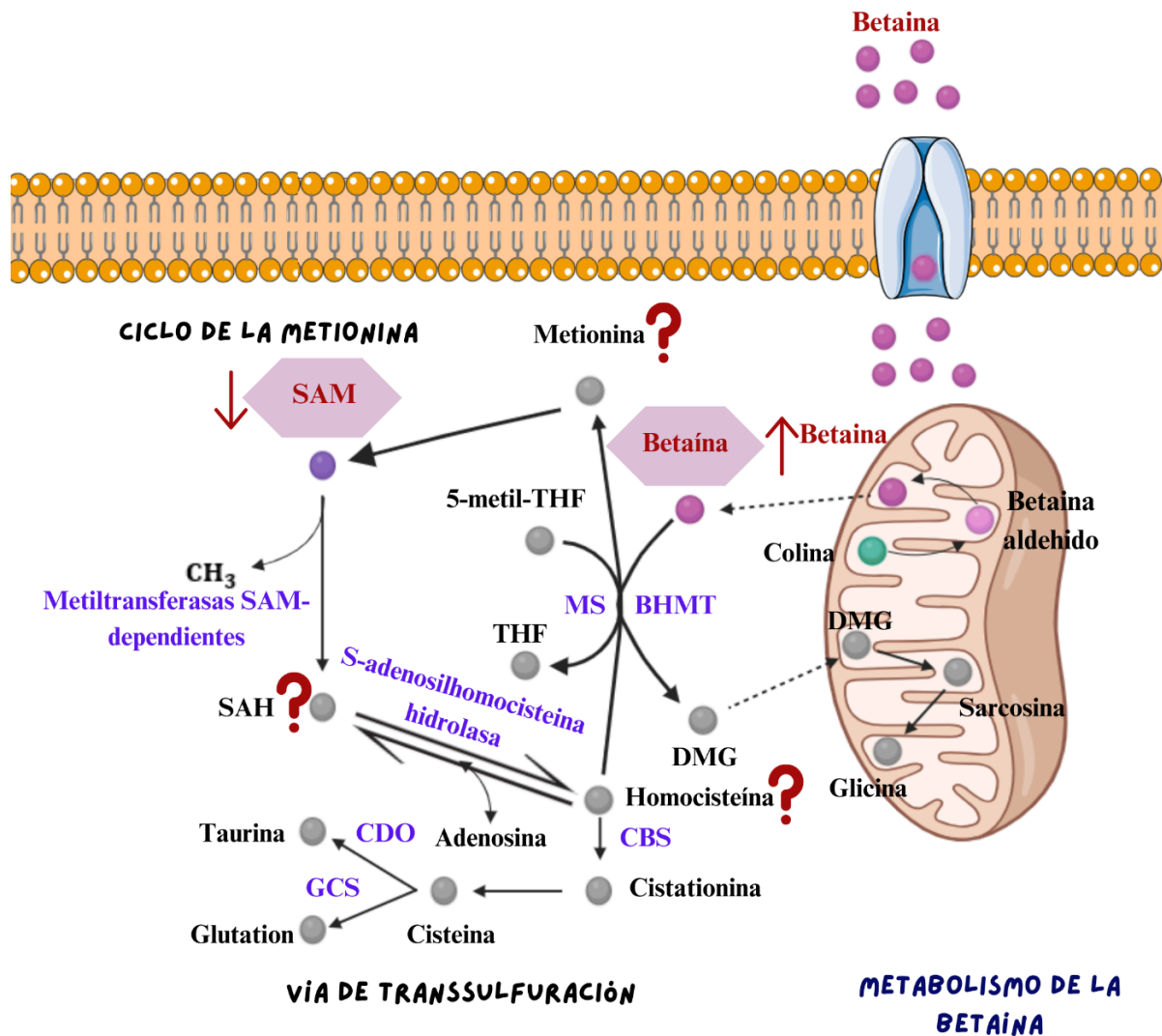


Figura 15. Metabolitos alterados en la ruta de la betaína y la metionina en individuos con DC. En la figura las flechas rojas indican los metabolitos que se encontraron a la alta o ala baja y los signos de interrogación los metabolitos que no se encontraron, pero que serían importantes en la ruta.

Interesantemente, en nuestros resultados solo detectamos la mitad de los metabolitos del metabolismo de la betaína y la metionina (Figura 15), ya que los metabolitos que más participan son la SAM y betaína. En este contexto, en nuestro estudio encontramos a SAM disminuido en

suero en individuos con DC; la SAM puede atravesar la barrera hematoencefálica en seres humanos, y desempeña un papel fundamental en la desaceleración del deterioro cognitivo al modular factores importantes, como el ciclo metabólico de la metionina, la metilación y el metabolismo de oxidación (Strous *et al.*, 2009). Inclusive se ha visto que la disminución de SAM en el líquido cefalorraquídeo puede provocar trastornos del metabolismo de la metilación en el sistema nervioso, así como la deficiencia de hiperhomocisteína, ácido fólico y vitamina B12 causando DC (de Leeuw *et al.*, 2020).

Por otro lado, el nivel bajo de SAM encontrado en individuos con DC, también nos indica que los niveles de SAH estarían siendo afectados (Figura 15) sin embargo, no encontramos alteración en este metabolito, lo cual puede ser debido a las limitantes antes mencionadas en el número de muestras y los métodos. Entre los metabolitos significativos también se encontró el llamado ácido litocólico, el cual es clave en la vía de la biosíntesis de los ácidos biliares y es producido en la microbiota intestinal a partir del ácido quenodesoxicólico, cabe destacar que este tiene un papel fundamental en el eje microbiota, intestino y cerebro (Marksteiner *et al.*, 2018; Dalile *et al.*, 2019). Inclusive en diversos estudios clínicos se ha visto que los niveles séricos de ácidos biliares hidrófobos tóxicos como el ácido litocólico son significativamente más altos en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y DCL en comparación con sujetos de control (Ehtezazi *et al.*, 2023).

Finalmente, dentro de los metabolitos exógenos no asociados a vías, encontramos a la uncarina C como uno de los compuestos con mayor presencia en individuos con DC. Interesantemente, este compuesto tiene uso etnomédico como antineuroinflamatorio (Snow *et al.*, 2019) y se encuentra en infusiones de té en la planta de la especie *Uncaria tomentosa* conocida como “uña de gato” (Tyler y Tyler, 2023), lo que sugiere que probablemente los individuos estén tomando como medicina alternativa para el DC estos remedios herbolarios. Inclusive se han reportado efectos de mejora de la memoria y antineuroinflamatorio en ratas de mediana edad (Garzón, 2019; Castilhos *et al.*, 2020). Una de las ramas que surgen a partir de estos resultados es el evaluar si estos remedios pueden ser utilizados como posible tratamiento o como biomarcador farmacoepidemiológico de DC en individuos que lo consuman.

11. Conclusiones

El metaboloma de individuos con DC sugiere que las vías de la metilhistidina y el ciclo betaína-metionina son las rutas más afectadas. Interesantemente, estas rutas están implicadas en procesos de neurodegeneración, estrés oxidativo y excitotoxicidad y su alteración podría estar provocando DC. Finalmente, cabe destacar que se logró estandarizar una nueva metodología que permitió hacer un análisis metabolómico global no dirigido con un equipo de MS de baja resolución (UPLC-TQ-MS). Por otro lado, el consumo de plantas como la *Uncaria tomentosa* y su eficiencia de compuestos presentes para el tratamiento de DC en modelos animales es conocido. Cabe destacar que los resultados obtenidos no permiten tener una relación causal debido a las limitaciones en el tamaño de muestra del estudio.

12. Perspectivas

Al ser un estudio exploratorio el número de muestras de individuos es bajo por lo que el poder estadístico no permite realizar conclusiones poblacionales, en este sentido, es necesario llevar a cabo un análisis con un tamaño de muestra mayor y de metabolómica dirigida al ciclo betaína-metionina. Además, al ser un estudio transversal, no estamos analizando variables causales en el estudio, por lo que será necesario realizar un estudio longitudinal o un seguimiento a los individuos.

13. Bibliografía

Al-Akl, N.S. *et al.* (2024) ‘Untargeted Metabolomic Profiling Reveals Differentially Expressed Serum Metabolites and Pathways in Type 2 Diabetes Patients with and without Cognitive Decline: A Cross-Sectional Study’, *International journal of molecular sciences*, 25(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25042247>.

Albert, M.S. *et al.* (2011) ‘The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease’, *Alzheimer’s & dementia: the journal of the Alzheimer’s Association*, 7(3), pp. 270–279.

American Psychiatric Association (2013) *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5*. American Psychiatric Publishing.

Amorim, J.A. *et al.* (2022) ‘Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases’, *Nature reviews. Endocrinology*, 18(4), pp. 243–258.

Babygirija, R. and Lamming, D.W. (2021) ‘The regulation of healthspan and lifespan by dietary amino acids’, *Translational medicine of aging*, 5, pp. 17–30.

Bedia, C. (2018) ‘Experimental Approaches in Omic Sciences’, in *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier (Comprehensive analytical chemistry), pp. 13–36.

Bidell, M.R., Hobbs, A.L.V. and Lodise, T.P. (2022) ‘Gut microbiome health and dysbiosis: A clinical primer’, *Pharmacotherapy*, 42(11), pp. 849–857.

Blackburn, E.H., Epel, E.S. and Lin, J. (2015) ‘Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection’, *Science*, 350(6265), pp. 1193–1198.

Blokzijl, F. *et al.* (2016) ‘Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life’, *Nature*, 538(7624), pp. 260–264.

Bucaciuc Mracica, T. *et al.* (2020) ‘MetaboAge DB: a repository of known ageing-related changes in the human metabolome’, *Biogerontology*, 21(6), pp. 763–771.

Bunning, B.J. *et al.* (2020) ‘Global metabolic profiling to model biological processes of aging in twins’, *Aging cell*, 19(1), p. e13073.

Cao, G. *et al.* (2020) ‘Large-scale targeted metabolomics method for metabolite profiling of human samples’, *Analytica chimica acta*, 1125, pp. 144–151.

Castilhos, L.G. *et al.* (2020) ‘*Uncaria tomentosa* improves cognition, memory and learning in middle-aged rats’, *Experimental gerontology*, 138(111016), p. 111016.

Chen, Y., Li, E.-M. and Xu, L.-Y. (2022) ‘Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics

Workflow', *Metabolites*, 12(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>.

Clevers, H. and Watt, F.M. (2018) 'Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype', *Annual review of biochemistry*, 87, pp. 1015–1027.

Collino, S. *et al.* (2013) 'Metabolic signatures of extreme longevity in northern Italian centenarians reveal a complex remodeling of lipids, amino acids, and gut microbiota metabolism', *PloS one*, 8(3), p. e56564.

Cova, I. *et al.* (2022) 'Translations and cultural adaptations of the Montreal Cognitive Assessment: a systematic and qualitative review', *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 43(1), pp. 113–124.

Cryan, J.F. *et al.* (2019) 'The Microbiota-Gut-Brain Axis', *Physiological reviews*, 99(4), pp. 1877–2013.

Dalile, B. *et al.* (2019) 'The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(8), pp. 461–478.

Deschenes, M.R. (2004) 'Effects of aging on muscle fibre type and size', *Sports medicine*, 34(12), pp. 809–824.

Drew, D.A., Weiner, D.E. and Sarnak, M.J. (2019) 'Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention', *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 74(6), pp. 782–790.

Edmands, W.M.B. *et al.* (2017) 'compMS2Miner: An Automatable Metabolite Identification, Visualization, and Data-Sharing R Package for High-Resolution LC-MS Data Sets', *Analytical chemistry*, 89(7), pp. 3919–3928.

Ehtezazi, T. *et al.* (2023) 'The Pathological Effects of Circulating Hydrophobic Bile Acids in Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's disease reports*, 7(1), pp. 173–211.

Estrella-Parra, E.A. *et al.* (2023) 'Intoxication associated with ayahuasca consumption, characterization, and comparative analysis of the beverage's components: A case report', *Revista colombiana de psiquiatria* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rcp.2023.02.002>.

Folstein, M.F., Folstein, S.E. and McHugh, P.R. (1975) "'Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician', *Journal of psychiatric research*, 12(3), pp. 189–198.

Fulop, T. *et al.* (2023) 'Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging', *Clinical reviews in allergy & immunology*, 64(2), pp. 109–122.

Gallegos, M. *et al.* (2022) '45 Years of the mini-mental state examination (MMSE): A perspective from ibero-america', *Dementia & neuropsychologia*, 16(4), pp. 384–387.

- Galluzzi, L. and Green, D.R. (2019) ‘Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery’, *Cell*, 177(7), pp. 1682–1699.
- Garza-Lombó, C. *et al.* (2019) ‘Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal’, *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 24(8), pp. 1305–1316.
- Garzón, L.P. (2019) ‘USOS MEDICINALES ASOCIADOS A LA UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*(Willd. exRoemer & Schultes) DC y *Uncaria guianensis*(Aublet) J.F. Gmel) EN COMUNIDADES TIKUNA DEL SUR DE LA AMAZONIA COLOMBIANA’, *Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.18542/ethnoscintia.v0i0.10253>.
- Gordon, L.B. *et al.* (2014) ‘Progeria: a paradigm for translational medicine’, *Cell*, 156(3), pp. 400–407.
- Gorgoulis, V. *et al.* (2019) ‘Cellular Senescence: Defining a Path Forward’, *Cell*, 179(4), pp. 813–827.
- Guijas, C. *et al.* (2018) ‘METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns’, *Analytical chemistry*, 90(5), pp. 3156–3164.
- Hasin, Y., Seldin, M. and Lusic, A. (2017) ‘Multi-omics approaches to disease’, *Genome biology*, 18(1), p. 83.
- Haug, K. *et al.* (2020) ‘MetaboLights: a resource evolving in response to the needs of its scientific community’, *Nucleic acids research*, 48(D1), pp. D440–D444.
- Hipp, M.S., Kasturi, P. and Hartl, F.U. (2019) ‘The proteostasis network and its decline in ageing’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(7), pp. 421–435.
- Holliday, R. (2006) ‘Epigenetics: a historical overview’, *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*, 1(2), pp. 76–80.
- Horgan, R.P. and Kenny, L.C. (2011) ‘“Omic” technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics’, *The obstetrician & gynaecologist : the journal for continuing professional development from the Royal College of Obstetricians & Gynaecologists*, 13(3), pp. 189–195.
- Hornak, J.P. (1999) ‘Teaching NMR using online textbooks’, *Molecules*, 4(12), pp. 353–365.
- Huang, Z. *et al.* (2022) ‘Single-cell analysis of somatic mutations in human bronchial epithelial cells in relation to aging and smoking’, *Nature genetics*, 54(4), pp. 492–498.
- Johnson, L.C. *et al.* (2019) ‘The plasma metabolome as a predictor of biological aging in humans’, *GeroScience*, 41(6), pp. 895–906.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) ‘KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes’, *Nucleic*

acids research, 28(1), pp. 27–30.

Karpievitch, Y.V. *et al.* (2014) ‘Metabolomics data normalization with EigenMS’, *PloS one*, 9(12), p. e116221.

Khoufache, K. *et al.* (2007) ‘Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells’, *BMC microbiology*, 7, p. 5.

Klein, M.S. and Shearer, J. (2016) ‘Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating Basic Research into Clinical Application’, *Journal of diabetes research*, 2016, p. 3898502.

Koulman, A. *et al.* (2009) ‘Semi-quantitative and structural metabolic phenotyping by direct infusion ion trap mass spectrometry and its application in genetical metabolomics’, *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 23(15), pp. 2253–2263.

de Leeuw, F.A. *et al.* (2020) ‘Specific Nutritional Biomarker Profiles in Mild Cognitive Impairment and Subjective Cognitive Decline Are Associated With Clinical Progression: The NUDAD Project’, *Journal of the American Medical Directors Association*, 21(10), pp. 1513.e1–1513.e17.

Legato, M.J. (2023) *Principles of Gender-Specific Medicine: Sex and Gender-Specific Biology in the Postgenomic Era*. Academic Press.

Levine, B. and Kroemer, G. (2019) ‘Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective’, *Cell*, 176(1-2), pp. 11–42.

Li, H., Ren, M. and Li, Q. (2022) ‘¹H NMR-Based Metabolomics Reveals the Intrinsic Interaction of Age, Plasma Signature Metabolites, and Nutrient Intake in the Longevity Population in Guangxi, China’, *Nutrients*, 14(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu14122539>.

Liu, M. *et al.* (2015) ‘Potential of serum metabolites for diagnosing post-stroke cognitive impairment’, *Molecular bioSystems*, 11(12), pp. 3287–3296.

Li, Y. (2021) ‘Modern epigenetics methods in biological research’, *Methods*, 187, pp. 104–113.

Londzin, P. *et al.* (2021) ‘Potential of Caffeine in Alzheimer’s Disease-A Review of Experimental Studies’, *Nutrients*, 13(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13020537>.

López-Hernández, Y. *et al.* (2021) ‘Targeted metabolomics identifies high performing diagnostic and prognostic biomarkers for COVID-19’, *Scientific reports*, 11(1), p. 14732.

López-Otín, C. *et al.* (2023) ‘Hallmarks of aging: An expanding universe’, *Cell*, 186(2), pp. 243–278.

López-Otín, C. and Kroemer, G. (2021) ‘Hallmarks of Health’, *Cell*, 184(1), pp. 33–63.

Luo, T. *et al.* (2024) ‘Risk factors and metabolomics of mild cognitive impairment in type 2

diabetes mellitus', *Frontiers in molecular biosciences*, 11, p. 1341290.

Macías-Núñez, J.F., Stewart Cameron, J. and Oreopoulos, D.G. (2007) *The Aging Kidney in Health and Disease*. Springer Science & Business Media.

Marksteiner, J. *et al.* (2018) 'Bile acid quantification of 20 plasma metabolites identifies lithocholic acid as a putative biomarker in Alzheimer's disease', *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 14(1), p. 1.

Mejia-Arango, S. *et al.* (2021) 'Effect of Demographic and Health Dynamics on Cognitive Status in Mexico between 2001 and 2015: Evidence from the Mexican Health and Aging Study', *Geriatrics*, 6(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/geriatrics6030063>.

Mihara, A. *et al.* (2022) 'Association of serum s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and their ratio with the risk of dementia and death in a community', *Scientific reports*, 12(1), p. 12427.

Miller, H.A. *et al.* (2020) 'Cell non-autonomous regulation of health and longevity', *eLife*, 9. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.62659>.

Nagana Gowda, G.A. and Raftery, D. (eds) (2019) *NMR-based metabolomics: Methods and protocols*. 1st edn. New York, NY: Humana Press (Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2037).

Nagana Gowda, G.A. and Raftery, D. (2021) 'NMR-Based Metabolomics', *Advances in experimental medicine and biology*, 1280, pp. 19–37.

Neuffer, J. *et al.* (2022) 'Exploration of the Gut-Brain Axis through Metabolomics Identifies Serum Propionic Acid Associated with Higher Cognitive Decline in Older Persons', *Nutrients*, 14(21). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu14214688>.

Nicolás-Ávila, J.A. *et al.* (2020) 'A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart', *Cell*, 183(1), pp. 94–109.e23.

Nielsen, J. and Jewett, M.C. (2007) *Metabolomics: A Powerful Tool in Systems Biology*. Springer Science & Business Media.

Pang, Z. *et al.* (2024) 'MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation', *Nucleic acids research*, 52(W1), pp. W398–W406.

Panyard, D.J., Yu, B. and Snyder, M.P. (2022) 'The metabolomics of human aging: Advances, challenges, and opportunities', *Science advances*, 8(42), p. eadd6155.

Park, H. and Kim, K. (2018) 'Concentrations of 2,4-Dichlorophenol and 2,5-Dichlorophenol in Urine of Korean Adults', *International journal of environmental research and public health*, 15(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph15040589>.

Pérez Palmer, N., Trejo Ortega, B. and Joshi, P. (2022) 'Cognitive Impairment in Older Adults:

- Epidemiology, Diagnosis, and Treatment’, *The Psychiatric clinics of North America*, 45(4), pp. 639–661.
- Perng, W. *et al.* (2017) ‘Metabolomic Determinants of Metabolic Risk in Mexican Adolescents’, *Obesity*, 25(9), pp. 1594–1602.
- Petersen, R.C. *et al.* (2018) ‘Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology’, *Neurology*, 90(3), pp. 126–135.
- Peters, T.M.A. *et al.* (2020) ‘Confirmation of neurometabolic diagnoses using age-dependent cerebrospinal fluid metabolomic profiles’, *Journal of inherited metabolic disease*, 43(5), pp. 1112–1120.
- Phuoc Long, N. *et al.* (2022) ‘Molecular perturbations in pulmonary tuberculosis patients identified by pathway-level analysis of plasma metabolic features’, *PloS one*, 17(1), p. e0262545.
- Qian, G. and Wang, Y. (2020) ‘Serum Metabolomics of Early Postoperative Cognitive Dysfunction in Elderly Patients Using Liquid Chromatography and Q-TOF Mass Spectrometry’, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, p. 8957541.
- Roberts, L.D. *et al.* (2012) ‘Targeted metabolomics’, *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 30, p. Unit 30.2.1–24.
- Rose, M.R. *et al.* (2012) ‘What is Aging?’, *Frontiers in genetics*, 3, p. 134.
- Roth, L.W. and Polotsky, A.J. (2012) ‘Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity’, *Maturitas*, 71(4), pp. 315–319.
- Sanchez-Contreras, M. and Kennedy, S.R. (2022) ‘The Complicated Nature of Somatic mtDNA Mutations in Aging’, *Frontiers in aging*, 2. Available at: <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.805126>.
- Sánchez-García, S. *et al.* (2017) ‘Frailty in community-dwelling older adults: association with adverse outcomes’, *Clinical interventions in aging*, 12, pp. 1003–1011.
- Schaefer, E.J. *et al.* (1995) ‘Lipoproteins, nutrition, aging, and atherosclerosis’, *The American journal of clinical nutrition*, 61(3 Suppl), p. 726S–740S.
- Schrimpe-Rutledge, A.C. *et al.* (2016) ‘Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions’, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>.
- Simó, R. *et al.* (2017) ‘Cognitive impairment and dementia: a new emerging complication of type 2 diabetes-The diabetologist’s perspective’, *Acta diabetologica*, 54(5), pp. 417–424.
- Smith, R. *et al.* (2014) ‘Proteomics, lipidomics, metabolomics: a mass spectrometry tutorial from

a computer scientist's point of view', *BMC bioinformatics*, 15 Suppl 7(Suppl 7), p. S9.

Smith, R.A. and Zhang, Q. (2023) 'Peak Pair Pruner: a post-processing software to MS-DIAL for peak pair validation and ratio quantification of isotopic labeling LC-MS(/MS) data', *Bioinformatics advances*, 3(1), p. vbad044.

Snow, A.D. *et al.* (2019) 'The Amazon rain forest plant *Uncaria tomentosa* (cat's claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles', *Scientific reports*, 9(1), p. 561.

Srivastava, S. (2019) 'Emerging Insights into the Metabolic Alterations in Aging Using Metabolomics', *Metabolites*, 9(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo9120301>.

Strous, R.D. *et al.* (2009) 'Improvement of aggressive behavior and quality of life impairment following S-adenosyl-methionine (SAM-e) augmentation in schizophrenia', *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 19(1), pp. 14–22.

Sun, L. *et al.* (2020) 'Risk Factors for Cognitive Impairment in Patients with Type 2 Diabetes', *Journal of diabetes research*, 2020, p. 4591938.

Swann, J.R. *et al.* (2013) 'Microbial-mammalian cometabolites dominate the age-associated urinary metabolic phenotype in Taiwanese and American populations', *Journal of proteome research*, 12(7), pp. 3166–3180.

Thoben, C. *et al.* (2023) 'Regarding the Influence of Additives and Additional Plasma-Induced Chemical Ionization on Adduct Formation in ESI/IMS/MS', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 34(5), pp. 857–868.

Tiffany, C.R. and Bäumlner, A.J. (2019) 'omu, a Metabolomics Count Data Analysis Tool for Intuitive Figures and Convenient Metadata Collection', *Microbiology resource announcements*, 8(15). Available at: <https://doi.org/10.1128/MRA.00129-19>.

Tizazu, A.M., Mengist, H.M. and Demeke, G. (2022) 'Aging, inflammaging and immunosenescence as risk factors of severe COVID-19', *Immunity & ageing: I & A*, 19(1), p. 53.

Tsukahara, H. and Kaneko, K. (2014) *Studies on Pediatric Disorders*. Springer.

Tyler, S.E.B. and Tyler, L.D.K. (2023) 'Reversing memory/cognitive impairment with medicinal plants targeting inflammation and its crosstalk with other pathologies', *Brain disorders & therapy*, 11(100094), p. 100094.

Vijg, J. and Dong, X. (2020) 'Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging', *Cell*, 182(1), pp. 12–23.

Villa, M.A. *et al.* (2004) 'Validation of a modified version of the mini-mental state examination

- (MMSE) in Spanish', *Neuropsychology, development, and cognition. Section B, Aging, neuropsychology and cognition*, 11(1), pp. 1–11.
- Wang, J. *et al.* (2020) 'Peripheral serum metabolomic profiles inform central cognitive impairment', *Scientific reports*, 10(1), p. 14059.
- Wishart, D.S. *et al.* (2007) 'HMDB: the Human Metabolome Database', *Nucleic acids research*, 35(Database issue), pp. D521–6.
- Wishart, D.S. *et al.* (2009) 'HMDB: a knowledgebase for the human metabolome', *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp. D603–10.
- Wishart, D.S. (2019) 'Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes', *Physiological reviews*, 99(4), pp. 1819–1875.
- Wishart, D.S. *et al.* (2022) 'HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022', *Nucleic acids research*, 50(D1), pp. D622–D631.
- Wong, R., Michaels-Obregon, A. and Palloni, A. (2017) 'Cohort Profile: The Mexican Health and Aging Study (MHAS)', *International journal of epidemiology*, 46(2), p. e2.
- World Health Organization (2015) *World Report on Ageing and Health*. World Health Organization.
- Xu, P. *et al.* (2022) 'The landscape of human tissue and cell type specific expression and co-regulation of senescence genes', *Molecular neurodegeneration*, 17(1), p. 5.
- Yang, Z. *et al.* (2022) 'High-resolution NMR metabolomics of patients with subjective cognitive decline plus: Perturbations in the metabolism of glucose and branched-chain amino acids', *Neurobiology of disease*, 171, p. 105782.
- Yan, S. *et al.* (2009) 'Metabonomic characterization of aging and investigation on the anti-aging effects of total flavones of Epimedium', *Molecular bioSystems*, 5(10), pp. 1204–1213.
- Yu, Z. *et al.* (2012) 'Human serum metabolic profiles are age dependent', *Aging cell*, 11(6), pp. 960–967.
- Zeng, W. and Bateman, K.P. (2023) 'Quantitative LC-MS/MS. 1. Impact of Points across a Peak on the Accuracy and Precision of Peak Area Measurements', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 34(6), pp. 1136–1144.
- Zhang, X. *et al.* (2016a) 'Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis', *Oncotarget*, 7(39), pp. 63437–63448.
- Zhang, X. *et al.* (2016b) 'Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis', *Oncotarget*, 7(39), pp. 63437–63448.
- Zhao, G. *et al.* (2018) 'Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications',

Frontiers in immunology, 9, p. 1070.

Zhao, Y. *et al.* (2022) ‘Alteration of plasma metabolic profile and physical performance combined with metabolites is more sensitive to early screening for mild cognitive impairment’, *Frontiers in aging neuroscience*, 14, p. 951146.

Zhao, Y. *et al.* (2022) ‘Blood levels of circulating methionine components in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis’, *Frontiers in aging neuroscience*, 14, p. 934070.

Zmora, N., Soffer, E. and Elinav, E. (2019) ‘Transforming medicine with the microbiome’, *Science translational medicine*, 11(477). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw1815>.

14. Anexos

14.1 Aspectos éticos y de bioseguridad.

Los principios éticos en los que se basa esta investigación están de acuerdo con la legislación nacional e internacional sobre investigación en seres humanos, considerando por lo menos: Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; D.O.F. 6-I-1987, Ley General de Salud; D.O.F. 7-II-1984 (última reforma publicada en D.O.F. 19-III-2014), la declaración de Helsinki (1964) para los estándares de protección para personas que participan en investigaciones y los principios éticos que deben regir la investigación clínica, junto con el Código de Nuremberg de 1947 y las Recomendaciones del CIOMS (Council for International Organization for Medical Sciences) promulgada en 1982 y las Guías de Buenas Prácticas de Investigación Clínica adoptadas por la Reunión Internacional de Armonización del 1996. Cabe destacar que el presente protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del IMSS y se encuentran con número de registro: 2020-785-108.

14.2 Resultados del ANOVA de una vía y estudio post-hoc

Tabla 6. Resultados de metabolitos significativos encontrados en DC y SDC. Los resultados son del ANOVA de una vía y el modelo lineal generalizado obtenidos de MetaboAnalyst 6.0.

	f.valor	p.value	-log10(p)	FDR	Fisher's LSD
Ácido ureidoglutárico	8.7282	0.0020479	2.6887	0.026592	QC - DC; QC - SDC
Ácido tridecanoico	8.7281	0.002048	2.6887	0.026592	QC - DC; QC - SDC
Proteasa inhibidor E-64	8.7193	0.0020574	2.6867	0.026592	QC - DC; QC - SDC
S-adenosil-L-metionina	8.7049	0.0020729	2.6834	0.026592	QC - DC; QC - SDC
Uncarina C	8.6576	0.0021248	2.6727	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Arbutina	8.6018	0.0021879	2.66	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Betaina	8.5861	0.0022059	2.6564	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Alcohol bencílico	8.5854	0.0022068	2.6562	0.026592	QC - DC; QC - SDC
β -D-Fructosa-6-fosfato	8.5832	0.0022093	2.6557	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Piroxicam	8.5799	0.0022132	2.655	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Verruculógono	8.5324	0.0022692	2.6441	0.026592	DC - QC; SDC - QC
2-5-Diclorofenol	8.5244	0.0022787	2.6423	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Ácido mefenámico	8.5157	0.0022892	2.6403	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Solasodina	8.4717	0.002343	2.6302	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Flutamida	8.4494	0.0023708	2.6251	0.026592	DC - QC; SDC - QC

Limonin	8.4476	0.0023731	2.6247	0.026592	QC - DC; QC - SDC
Cantaxantina	8.4458	0.0023754	2.6243	0.026592	DC - QC; SDC - QC
S-Hexilglutación	8.4427	0.0023792	2.6236	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Daunorubicina	8.4346	0.0023895	2.6217	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Tomatidina	8.4234	0.0024037	2.6191	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Soyasaponina I	8.4216	0.002406	2.6187	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Ácido heptanoico	8.4023	0.0024308	2.6143	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Ácido tetradecanoico	8.3761	0.0024649	2.6082	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Chlormequat	8.3069	0.0025573	2.5922	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Chloramben	8.2277	0.002668	2.5738	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Lufenuron	8.2266	0.0026695	2.5736	0.026592	DC - QC; SDC - QC
Ácido litocólico	8.1538	0.0027759	2.5566	0.026628	DC - QC; SDC - QC
N-Benziladenina	7.8333	0.0033038	2.481	0.03056	DC - QC; SDC - QC
Bitertanol	7.2853	0.0044827	2.3485	0.040036	QC - DC; QC - SDC

14.3 Resultados de sPLSDA

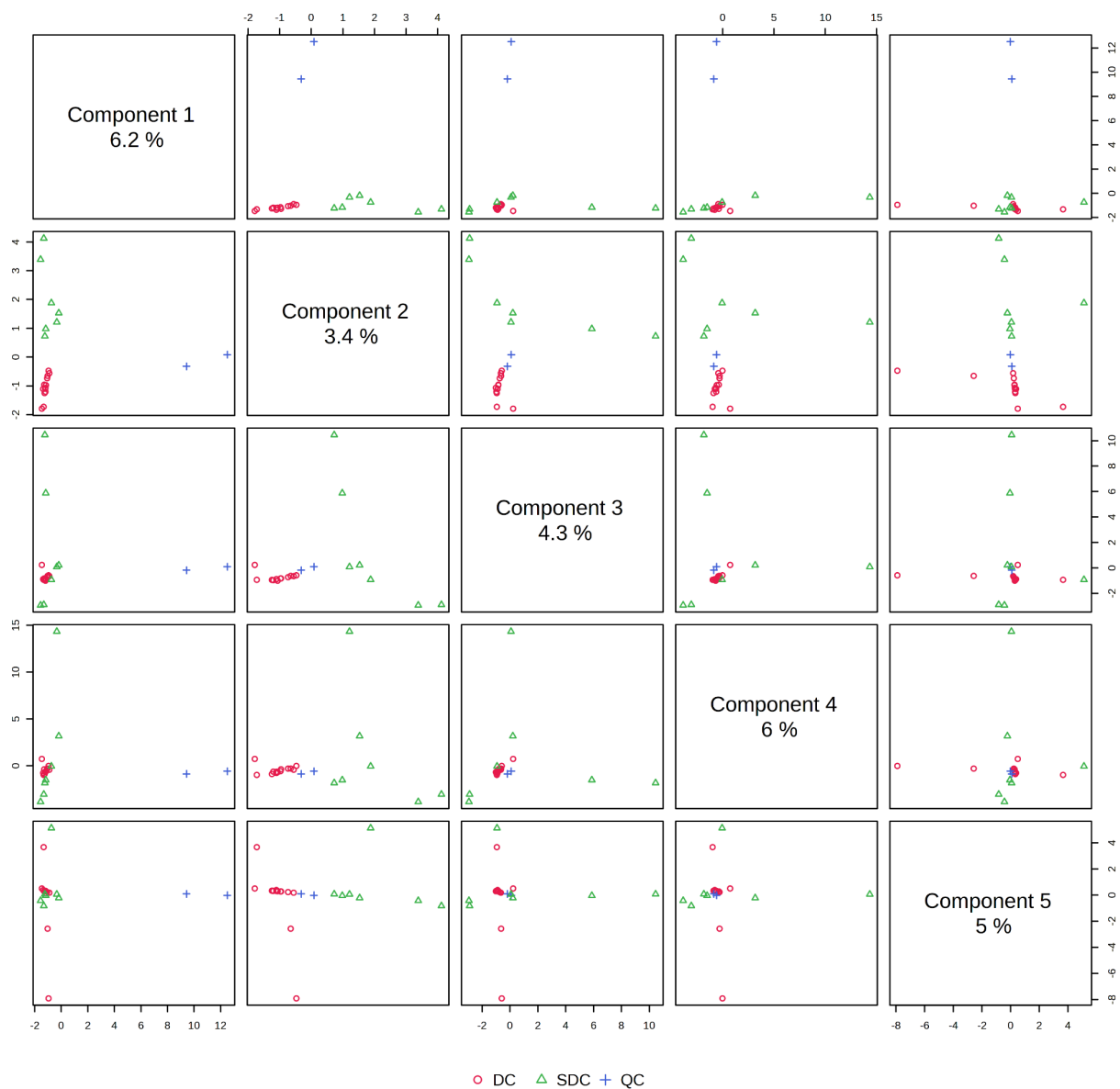


Figura 1A. Gráfico de puntuaciones por pares de los 5 componentes en el sPLSDA. Se muestra por porcentaje la cantidad de metabolitos que se detectaron en cada componente y nos muestra que muchos componentes se encuentran en el PC1.