

La detección de la trimetilamina N-óxido (N-óxido de trimetilamina, TMAO) con métodos no invasivos es importante ya que es un biomarcador para detección de complicaciones renales en pacientes diabéticos tipo 2. En este trabajo se analiza el TMAO en orina sintética con los constituyentes principales como son el agua, cloruro de sodio, urea y creatinina. Las concentraciones de TMAO se fueron variando y caracterizando con espectroscopia Raman; los resultados obtenidos nos permiten la identificación en la ventana espectral de 200 a 3800  $\text{cm}^{-1}$  para detectar la presencia de TMAO en la muestra preparada. Se prepararon diferentes soluciones, cada una de ellas con una cantidad adicional del anhidro TMAO (100, 50, 10 y 1 ppm). Usando el espectro Raman como características representativas de la muestra, usando análisis de componentes principales (PCA) y máquinas de soporte vectorial (SVM), se predijeron las distintas concentraciones obteniendo una exactitud de 76%. Este estudio preliminar muestra que la espectroscopia Raman puede usarse como una herramienta clínica para detección de TMAO en orina.

## INTRODUCCIÓN

El N-óxido de trimetilamina es un pequeño compuesto orgánico de la clase de óxidos de amina. El TMAO se forma a partir de trimetilamina (TMA), que se genera por la acción de la microbiota intestinal a partir de la colina y la fosfatidilcolina (lecitina) de la dieta y el catabolismo de la L-carnitina a través de dos reacciones microbianas secuenciales; primero se convierte en el metabolito intermedio  $\gamma$ -butirobetaína y luego en TMA, que se oxida más rápidamente por la monooxigenasa 3 que contiene flavina (FMO3) en la región hepáticas para formar TMAO [1,2] que recientemente ha ganado atención debido a su papel potencial en el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades renales, así como, complicaciones de la diabetes tipo 2 (DT2) [3,4].

La espectroscopia Raman proporciona información sobre las estructuras moleculares y los enlaces químicos de las sustancias mediante la detección de fotones esparcidos de forma inelástica. Las frecuencias vibratorias de cada enlace químico dentro de una molécula son diferentes, por lo que sus "huellas digitales" se pueden ver de forma única en el espectro [5]. Por lo tanto, la espectroscopia Raman tiene un potencial significativo para proporcionar información valiosa a los médicos en el diagnóstico [6]. La técnica Drop Coating Deposition Raman Spectroscopy (DCDRS), que consiste en el depósito de una microgota sobre un sustrato para que luego del secado, se obtenga el patrón de "anillos de café" y en ellos se adquiere el espectro Raman, detectando concentraciones bajas del analito. Se ha demostrado que la técnica DCDRS es un método altamente reproducible y sensible para obtener espectros Raman a partir de soluciones de baja concentración [7,8]. Por ello se propone en este trabajo usar la técnica de espectroscopia micro-Raman combinado con métodos multivariante para la detección e identificación de TMAO en muestras de orina sintética.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La orina sintética fue preparada utilizando TMAO, cloruro de sodio, creatinina y urea; estos compuestos fueron adquiridos de las empresas Sigma Aldrich y MP Biomedicals, respectivamente. Se prepararon disoluciones estándar con TMAO y agua desionizada y un segundo conjunto de disoluciones para crear la orina sintética obteniendo cuatro concentraciones como fueron 100, 50, 10 y 1 ppm. La composición de la orina sintética se realizó emulando su composición reportada por Sarigul y colaboradores [9].

El análisis y caracterización en este trabajo fue usando un micro-Raman de la marca WiTec, el cual consta de un microscopio confocal con diferentes objetivos (10X, 20X, 50X y 100X), una fuente láser de Nd: YV04 a 532 nm a una potencia de 18.4  $\mu\text{W}$  para nuestras muestras. Se adquirieron los espectros Raman utilizando el objetivo de 100X. Las muestras de cada concentración tanto de TMAO puro, como de orina sintética fue depositado una microgota sobre un sustrato de papel aluminio, el cual después de su evaporación formó un patrón de "anillo de café" donde se concentra la mayor cantidad de residuos, sobre una región homogénea se adquirió un mapa Raman de 20x20 micras obteniendo 400 espectros para identificar cada concentración. Después del tratamiento computacional de las señales Raman los espectros fueron normalizados usando la intensidad de la banda 833  $\text{cm}^{-1}$  (perteneciente al enlace N-O stretch) del TMAO usando el espectro de 100 ppm puro, con el fin de reducir las diferencias de intensidad entre las demás concentraciones.

El análisis de componentes principales (PCA) fue usado para encontrar los componentes principales que maximicen la varianza de las características más importantes de los espectros Raman del TMAO puro a diferentes concentraciones. Para ello tomamos 90 espectros representativos de las diferentes concentraciones en la región asociada a la banda del TMAO (833  $\text{cm}^{-1}$ ), calculando las primeras 3 componentes principales que separan mejor los grupos de concentración.

Siguiendo con la metodología empleada en este trabajo, después de calcular los PCA de los 90 espectros representativos de cada concentración en la región del TMAO (alrededor de 833  $\text{cm}^{-1}$ ), se usaron las componentes (PC) 1 y 2, ya que estas nos permitieron una buena separación entre las diferentes concentraciones del TMAO, dichos PC1 y PC2 se utilizaron como datos de entrada en las SVM.

## RESULTADOS

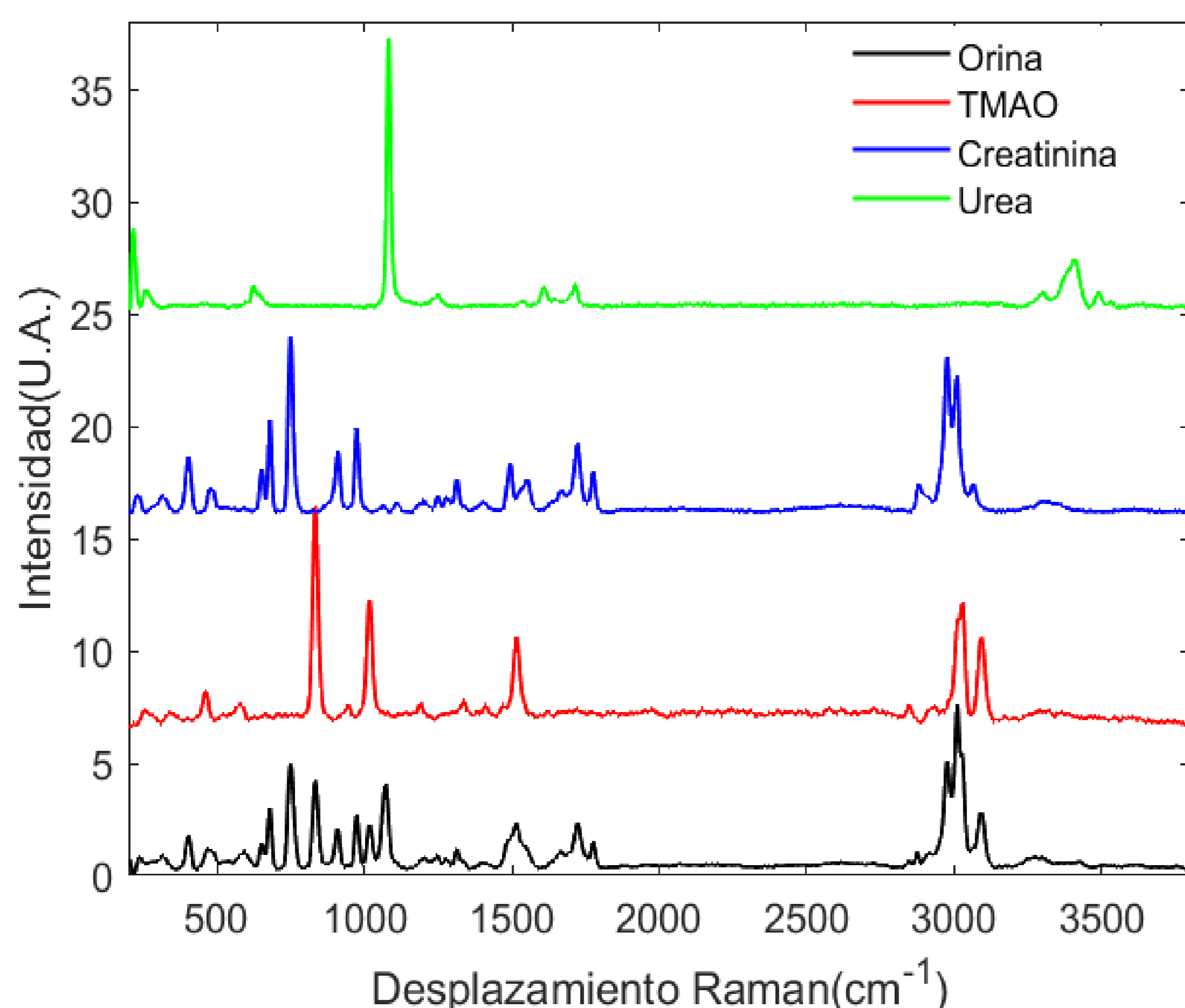


Figura 1. Espectros Raman de orina sintética, TMAO, creatinina y Urea, en la ventana espectral de 200-3800  $\text{cm}^{-1}$

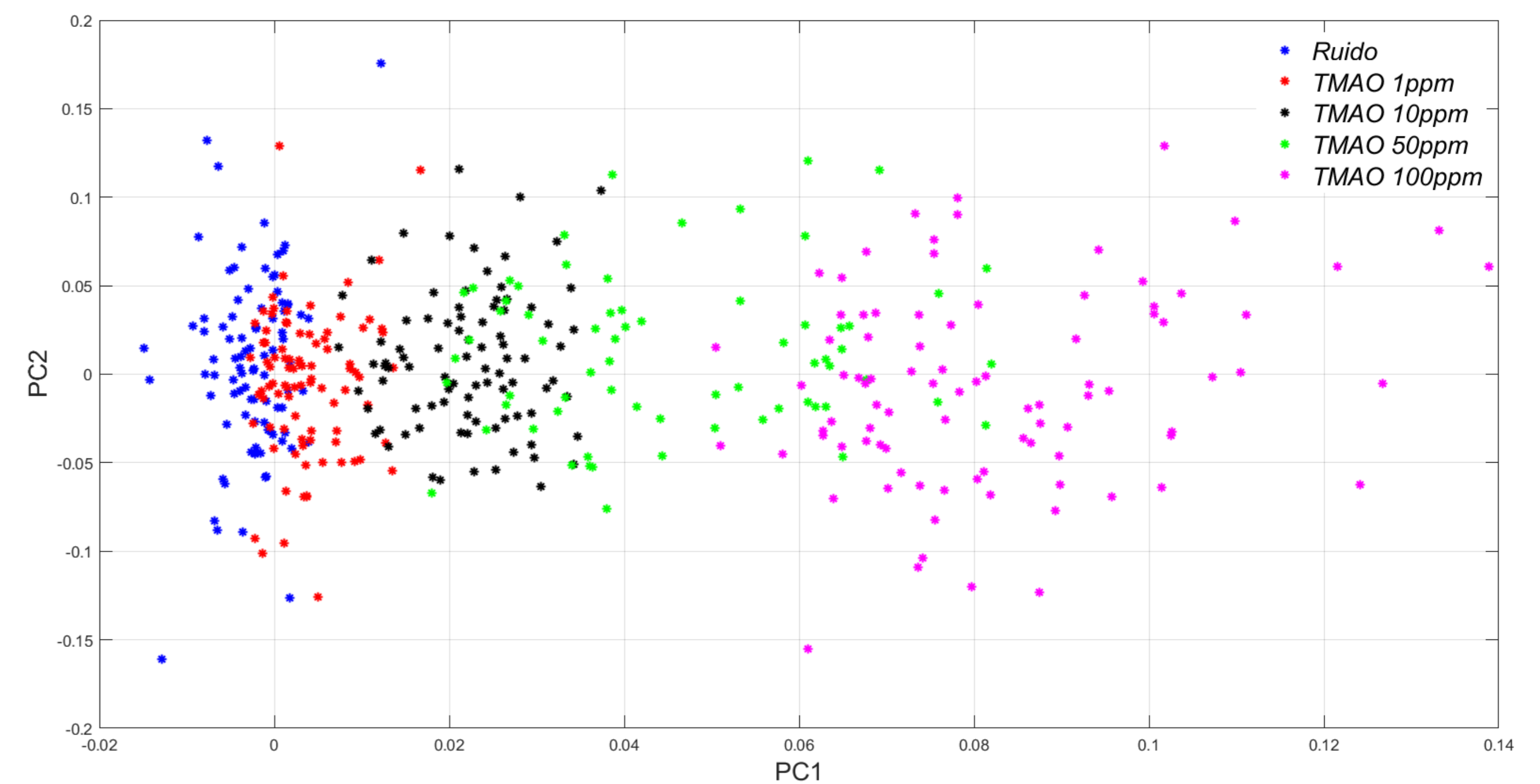


Figura 2. Espectros Raman de las distintas concentraciones de TMAO puro en el espacio de las componentes

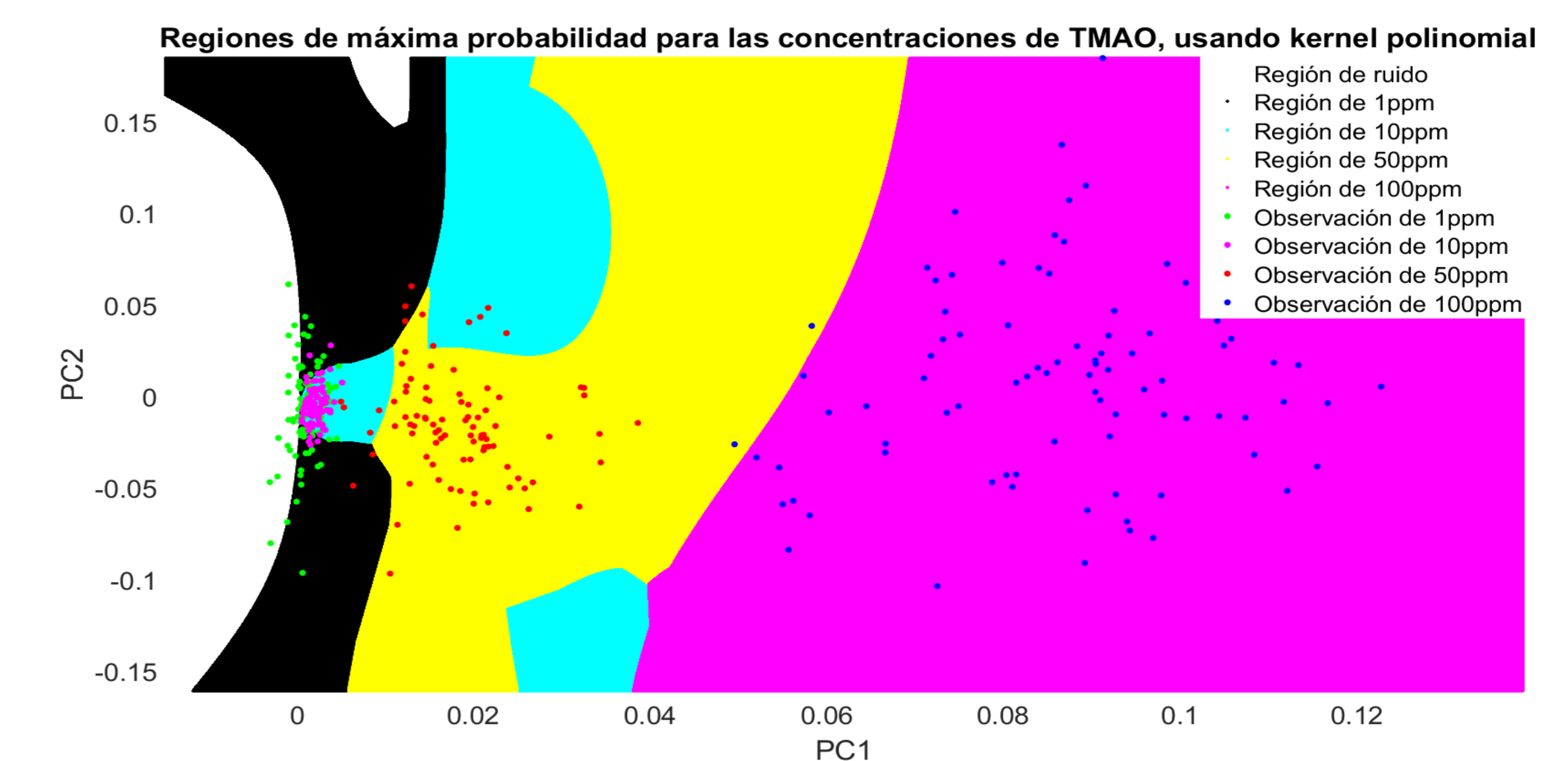


Figura 3. Proyecciones de las concentraciones de TMAO en orina sintética sobre las regiones de máxima probabilidad de TMAO puro.

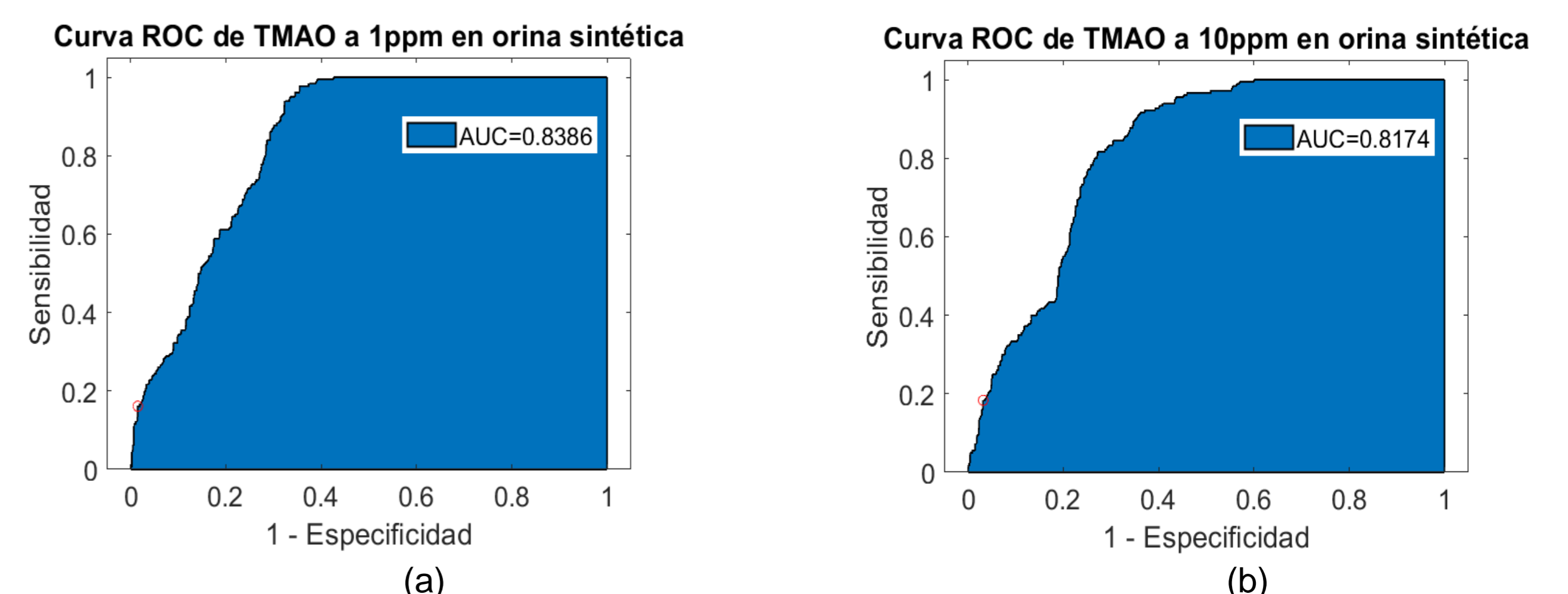


Figura 4. Curvas ROC de la clasificación de concentraciones de TMAO usando PCA-SVM para (a) 1ppm vs todas las concentraciones, (b) 10ppm vs todas las concentraciones.

Tabla 1. Área bajo la curva ROC (AUC) de las diferentes concentraciones de TMAO en orina sintética con las funciones kernel.

Concentraciones de TMAO	AUC kernel Lineal	AUC kernel Polinomial	AUC kernel Gaussiano
1 ppm	0.5408	0.8386	0.8478
10 ppm	0.5746	0.8174	0.8373
50 ppm	0.5142	0.8821	0.8974
100 ppm	0.9816	0.9824	0.9821

Tabla 2. Exactitud (accuracy) del método usando las diferentes funciones kernel.

Funciones kernel	Exactitud
Lineal	44.16%
Polinomial	76.94%
Gaussiano	75%

## CONCLUSIONES

En este trabajo evaluamos la detección de analitos en residuos sólidos sobre sustratos de papel aluminio, encontrando que las diferentes concentraciones de TMAO en orina sintética pueden ser identificadas usando la combinación de los métodos PCA-SVM en la región espectral del TMAO (800 a 870  $\text{cm}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el TMAO puede ser identificado usando espectroscopia micro-Raman y métodos multivariante, concluyendo que el uso de un kernel polinomial es la mejor función para clasificar las distintas concentraciones de TMAO en orina sintética. Dichos resultados indican que la espectroscopia micro-Raman combinado con métodos multivariante son una buena herramienta en el uso de identificación de biomarcadores, con miras a una aplicación en muestras biológicas.

## REFERENCIAS

- [1] Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature 2011, 472, 57-65.
- [2] Koeth R.A., Wang Z., Levison B.S., et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nature Medicine 2013, 19, 576-585.
- [3] Papandreou C., Bulló M., Zheng Y., et al. Plasma trimethylamine-N-oxide and related metabolites are associated with type 2 diabetes risk in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) trial. American Journal of Clinical Nutrition 2018, 108, 163-173.
- [4] Flores-Guerrero J.L., van Dijk P.R., Connolly M.A., et al. Circulating Trimethylamine N-Oxide Is Associated with Increased Risk of Cardiovascular Mortality in Type-2 Diabetes: Results from a Dutch Diabetes Cohort (ZODIAC-59). Journal of Clinical Medicine 2021, 10, 2269.
- [5] Smith E.; Dent, G. Modern Raman Spectroscopy: A practical Approach, 1<sup>st</sup> ed. UK John Wiley & Sons, 2005: pp. 2-19.
- [6] Choo-Smith L.P., Edwards H.G.M., Endtz H.P., et al. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. Biopolymers 2002, 67, 1-9.
- [7] Huang Z., Wang J., Lin J., et al. Drop coating deposition Raman spectroscopy as a potential tool for identification and determination of fructose in seminal plasma. Journal of Raman Spectroscopy 2014, 45, 10, 879-883.
- [8] Kocíšová E., Procházka M., Vaculčíková L. Drop-coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy as a tool for membrane interaction studies: Liposome-Porphyrin complex. Appl. Spectrosc 2015, 69, 8, 939-45.
- [9] Sarigul N., Korkmaz F. & Kurultak İ. A new synthetic urine protocol to better imitate human urine. Sci Rep 2019, 9, 20159.