



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Utilización combinada de técnicas analíticas y quimiométricas en lipidómica orientada al descubrimiento de biomarcadores asociados a alteraciones en el metabolismo de lípidos
Autor/es
Irene Arenzana Ramila
Director/es
Consuelo Pizarro Millán y José María González Sáiz
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



Utilización combinada de técnicas analíticas y quimiométricas en lipidómica orientada al descubrimiento de biomarcadores asociados a alteraciones en el metabolismo de lípidos, tesis doctoral de Irene Arenzana Ramila, dirigida por Consuelo Pizarro Millán y José María González Sáiz (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

***UTILIZACIÓN COMBINADA DE TÉCNICAS ANALÍTICAS
Y QUIMIOMÉTRICAS EN LIPIDÓMICA ORIENTADA AL
DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES ASOCIADOS
A ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE LOS
LÍPIDOS***

TESIS DOCTORAL

Irene Arenzana Rámila

LOGROÑO, 2017

***Utilización combinada de técnicas analíticas y quimiométricas
en lipidómica orientada al descubrimiento de biomarcadores
asociados a alteraciones en el metabolismo de los lípidos***



Tesis doctoral

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Química

Área de Química Analítica e Ingeniería Química

UTILIZACIÓN COMBINADA DE TÉCNICAS ANALÍTICAS Y
QUIMIOMÉTRICAS EN LIPIDÓMICA ORIENTADA AL
DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A
ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

Memoria presentada por

Irene Arenzana Rámila

para conseguir el grado de

Doctor en Química con Mención Internacional

Logroño, 2017



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Dra. Consuelo Pizarro Millán, Catedrática de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja, y

Dr. José María González Sáiz, Catedrático de Ingeniería Química del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja

Por la presente tesis declaran que,

La Memoria titulada “Utilización combinada de técnicas analíticas y quimiométricas en lipidómica orientada al descubrimiento de biomarcadores asociados a alteraciones en el metabolismo de los lípidos”, que presenta **Dña. Irene Arenzana Rámila**, Licenciada en Química, ha sido realizada en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Lo que hacen constar en Logroño, a 21 de julio de 2017

Fdo: Consuelo Pizarro Millán

Fdo: José María González Sáiz

ABSTRACT

The research focused on metabolite analysis is an analytical discipline that is currently gaining much relevance thanks to the large amount of biological information from an organism that it reveals. The increasing knowledge of metabolic and lipid profiles has revealed the prominent role played by some biological compounds in health as well as in the development of various diseases and disorders.

In turn, special care must be taken in the pre-analytical stages and the pretreatment of samples that are carried out in clinical laboratories in the order to show how these procedures can condition and alter the metabolites of biological samples. For this reason, all possible parameters or variables involved both in the pre-analytical stages and the pretreatment of the samples involved must be analyzed since they can introduce inaccuracies and distort the results. It has been observed how various stimuli in the sample manipulation prior to the analysis can trigger an undesirable response in the metabolites, inducing a series of transformations such as degradation, which result in the modification of the chemical characteristics of starting samples. The analysis of these altered samples irreversibly compromises the quality of the results that can be obtained from them.

For this reason, one of the main objectives of this doctoral thesis is to provide clinical laboratories with a series of reliable protocols and methodologies for the pre-analytical and sample pretreatment stages of the analysis, thus minimizing the error bias that can be introduced at these stages. These errors translate in inaccurate and incongruent values with the reality of the biological sample and it is irremediably associated with an imprecise diagnosis of the organism under study. Firstly, emphasis will be placed on the processes involved in the sample thawing stages and liquid-liquid extraction pretreatment.

Furthermore, this work also aims to show how the combined use of analytical methods based on "fingerprint" techniques together with chemometric tools achieve the detection and identification of markers of different stages of the same disease in people who have an altered metabolism. In particular, this doctoral thesis has focused on obtaining the metabolic and lipid profiles through the use of infrared spectroscopy and liquid chromatography in order to distinguish and classify patients with different states of viral disease induced by the human immunodeficiency virus.

RESUMEN

La investigación centrada en los análisis de metabolitos es una disciplina analítica que actualmente está ganando mucha relevancia gracias a la enorme cantidad de información biológica que proporciona de los organismos. El creciente conocimiento de los perfiles metabólicos y lipidómicos ha revelado el prominente papel que desempeñan algunos compuestos biológicos tanto en la salud como en el desarrollo de enfermedades y trastornos.

A su vez, se debe de tener especial cuidado con las etapas pre-analíticas y pretratamientos de las muestras que son llevados a cabo en los laboratorios clínicos porque estos procedimientos pueden condicionar y alterar los metabolitos de las muestras biológicas. Por este motivo, todos los posibles parámetros o variables que están involucrados tanto en las etapas pre-analíticas como en los pretratamientos de muestra deben ser analizados, ya que pueden introducir imprecisiones y distorsiones en los resultados. Se ha observado cómo diversos estímulos en la manipulación de la muestra antes de la realización del análisis pueden desencadenar una respuesta indeseable en los metabolitos, induciendo una serie de transformaciones tales como la degradación, dando como resultado la modificación de las características químicas de las muestras originales. El análisis de estas muestras alteradas irreversiblemente compromete la calidad de los resultados que pueden obtenerse de ellas.

Por esta razón, uno de los principales objetivos de la presente tesis doctoral es proporcionar a los laboratorios una serie de protocolos y metodologías fiables para las etapas pre-analíticas y de preparativa de muestras para los posteriores análisis, minimizando el sesgo de error que se puede introducir en estas etapas. Estos errores se traducen en valores inexactos e incongruentes con la realidad de la muestra biológica y son irremediablemente asociados con un diagnóstico impreciso del organismo a estudio. En primer lugar, se hará hincapié en los procesos involucrados en la etapa pre-analítica de descongelación y en el tratamiento de muestra llevado a cabo en la extracción líquido-líquido.

Además, este trabajo pretende mostrar cómo el uso combinado de métodos analíticos basados en técnicas de "huellas dactilares" junto con herramientas quimiométricas logra la detección e identificación de biomarcadores de diferentes estadios de la misma enfermedad en personas que tienen un metabolismo alterado. En concreto, esta tesis doctoral se ha centrado en obtener los perfiles metabólicos y lipídicos mediante el empleo de espectroscopia infrarroja y cromatografía líquida con el fin de discriminar y

clasificar a pacientes con diferentes estados de enfermedad virológica inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana.

A mis padres y hermano

“En algún lugar,
algo increíble está esperando
ser conocido.”

(Carl Sagan)

AGRADECIMIENTOS

Han pasado varios años desde que comencé mi andadura en este proyecto y ha llegado el momento de agradecer a todos aquellos que han aportado su granito de arena para que este viaje tuviese el final que se merece o para que este trabajo de investigación se llevara a cabo, se mire por donde se mire.

A mis directores de tesis Consuelo y José María, gracias por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de doctorado, por sus consejos y la colaboración para llevar esta investigación a cabo.

A Pedro Alberto y Pilar, por iniciarme en el mundo de la investigación en la Universidad y alimentar el gusanillo por la experimentación. Gracias por la ayuda que me habéis brindado desde que os conocí.

A Nuria, por todo lo que me ha enseñado en el laboratorio, por ayudarme cuando se me presenta alguna dificultad y por ser un gran apoyo durante la etapa experimental. También debo de agradecer los buenos ratos que he vivido en el laboratorio y fuera de él, con María y Laura.

A Marco, por acogerme con los brazos abiertos durante mi periplo por Italia, fue una experiencia inolvidable. Espero que la frase con la que nos despedimos se cumpla: “No dudes que nos volveremos a ver, ya que la ciencia logrará que nos encontremos en un futuro no muy lejano”. A Mirdula y a Nai Min, por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio durante la estancia. Chicas no os hagáis derogar y hacerme una visita. Al grupo de los hispanohablantes: Albertos, Hugo, Ketani, Zöltan, Carol, Valerio, Andrea Lorena (Lorena a secas para los italianos), Carol... por la inolvidable fiesta de bienvenida, los viajes de domingo por Italia y todos los aperitivos donde no faltaba el embutido riojano. Tengo que resaltar a una persona adoptada al grupo hispanohablante, pero que se integró como una verdadera española, Franchesca, mi compañera de piso; por ser como una hermana para mí en Italia y creo que ella tiene que saber que tiene una hermana en España. Ánimo Franchesca que te queda muy poquito para estar en esta misma situación.

A Marivel, por ser una incansable compañera de viajes en bus, por todos los momentos de desahogo, de desquiciamiento, aunque siempre nos vamos a quedar con lo positivo, “las risas”.

A mi amigo Pepeto, por abrirme los ojos e introducirme la idea de la docencia, siempre valorándome un montón y confiando en mis capacidades, ya que como dice él: “la investigación y la docencia tienen que ir de la mano”. Ya sabes Pepeto, que un vino de Rioja y un digestivo es lo mínimo que te debo.

A mi alemana del alma, Celia, porque ha estado en todo momento apoyándome y desesperadilla porque fuese a pasar una temporada por tierras alemanas. Por fin, voy a poderle dar esa alegría cuando realice esa visita o

estancia, quién sabe, y no me puedo olvidar de que ese piano me está esperando.

A mis amigos de la niñez, Miguel, Vane, Eguizábal, Leire, Solana... que cada vez se nos hace más complicado las quedadas, pero cuando nos reunimos siempre es para contar y reírnos de nuestras hazañas. Miguel monta la sombrilla que tengo el moreno flexo...

Por mis recientes amigos que por el buen entendimiento parece que nos hemos conocido de toda la vida ¡Te lo debo, Albacete! La Luna fue el lugar donde nos unió y gracias a la mesa de inglés, logré conocer a wonderful people. A Cortes, por ser una gran amiga que me hizo disfrutar una aventura en tierras de quijotes y por abrirme a su familia y considerarme como una "primi" más. A Lourdes, Alicia y Javi os agradezco los buenos momentos, risas y tardeos que hemos disfrutado, al próximo invito yo. A otro perdido en Albacete, mi grandísimo Emmanuel, mi médico particular, siempre dudando de las terapias chinas y aguantando nuestras dudas médicas y nuestros autodiagnósticos... Nunca cambies tu manera de ver la vida ni tu sonrisa, eres un luchador y un campeón, aunque todavía te falta subir piedras como los del Norte. A Lucas, por ser mi guía turístico para que pudiera conocer rincones con encanto manchego, pero no todos porque siempre hay que dejar alguno por ver para regresar. A Jonathan por tener ese humor inglés tan especial. Y no se me puede olvidar a Pilar, mi terremoto andaluz, que lo mismo te bailaba en un tablado como te da una clase de historia del arte. Por último, a la persona que pone la cordura en el grupo, Paco. Ya sabéis todos vosotros que tenéis una casa abierta en tierras riojanas. Espero que este año nos una el cuerpo de profesorado.

A mis alumnos, ya que todos los días me recibían con una sonrisa desde la primera hora de la mañana, por el asombro que les ocasionaba comentarles que yo todavía era alumna y que me sentía totalmente identificada con ellos y nunca se me olvidará la grandísima despedida. A mis compis del instituto, por los recreos tan animados, por lo bien que cantábamos en el coro y por el ambiente familiar que me habéis dedicado en esa gran familia de las químicas.

Este último párrafo se lo tengo que brindar a mi gran familia, por el apoyo incasable que me han otorgado en el periodo de desesperación, agobios y siempre confiando en mí. Para mí, un aliado fundamental en esta tesis es mi hermano, un gran investigador y profesional, siempre conseguirás lo que te propongas.

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la ayuda económica y logística prestada por las siguientes instituciones:

- Universidad de La Rioja, por la beca F.P.I. concedida en 2011, y ayuda para la realización de tesis doctorales (ATUR), así como por la infraestructura proporcionada durante la realización de la misma.
- Instituto Fondazione Edmund Mach – Sección de Investigación e Innovación – Gestión de Datos Bioestadísticos – Departamento de Biología Computacional. Grupo de investigación dirigido por Pietro Franceschi bajo la tutela de Marco Giordan.
- Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto (CTQ2011-26603).

Asimismo, esta tesis ha podido llevarse a cabo gracias a las muestras proporcionadas por el Banco de Sangre de La Rioja y a los investigadores del Área de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja.

INTRUCCIONES PARA LA LECTURA

La presente Tesis Doctoral está dividida en seis capítulos numerados del 1 al 6. Cada capítulo está dividido a su vez en secciones (por ejemplo, 1.1., 1.2...) con entidad propia. Por otra parte, dichos capítulos poseen su propia bibliografía recogida al final de los mismos y numerada de manera independiente.

Las tablas y figuras están numeradas indicando la sección en el que se encuentran (los dos primeros dígitos) y el número correspondiente de figura o tabla (tercer dígito). Las ecuaciones, en cambio, están numeradas de forma independiente en cada capítulo con el número correspondiente entre paréntesis.

Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. <i>Disciplinas ómicas.....</i>	3
1.2. <i>Lipidómica.....</i>	4
1.3. <i>Acondicionamiento de la muestra: Desde la recolección hasta el análisis.....</i>	7
1.4. <i>Enfermedades inducidas por el VIH, el VHC y la co-infección por ambos virus.....</i>	10
1.4.1. <i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....</i>	11
1.4.2. <i>Virus de la Hepatitis C.....</i>	14
1.4.3. <i>Co-infección con VIH/VHC.....</i>	15
1.4.4. <i>Alteraciones metabólicas inducidas por la medicación aplicada para combatir estas enfermedades.....</i>	16
Capítulo 2. Justificación y objetivos.....	23
Capítulo 3. Fundamentos teóricos.....	27
3.1. <i>Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas.....</i>	29
3.1.1. <i>Etapa pre-analítica congelación-descongelación: Conservación de muestras biológicas en laboratorios clínicos.....</i>	29
3.1.2. <i>Extracción líquido-líquido.....</i>	32
3.1.3. <i>Extracción asistida por ultrasonidos.....</i>	32
3.2. <i>Cromatografía líquida.....</i>	33
3.2.1. <i>Métodos de ionización LC-MS.....</i>	36
3.2.2. <i>Espectrometría de masas.....</i>	38
3.2.2.1. <i>Analizador de cuadrupolo.....</i>	39
3.2.2.2. <i>Analizador de tiempo de vuelo (TOF).....</i>	39
3.2.2.3. <i>Analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF).....</i>	40
3.3. <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....</i>	41
3.3.1. <i>Fundamento de la espectroscopia infrarroja.....</i>	41

3.3.2. Componentes instrumentales y funcionamiento de FT-IR.....	42
3.3.3. Ventajas del FT-IR.....	43
3.4. <i>Quimiometría y análisis de datos</i>	44
3.4.1. Métodos de pretratamiento de datos.....	44
3.4.1.1. Autoescalado.....	44
3.4.1.2. Suavizado y cálculo de derivadas.....	45
3.4.1.3. Autoescalado de fila (SNV).....	45
3.4.1.4. Corrección de la línea base.....	45
3.4.1.5. Alineamiento de señales cromatográficas.....	46
3.4.2. Métodos de reconocimiento de patrón, clasificación y modelado.....	46
3.4.2.1. Análisis de Componentes Principales.....	47
3.4.2.2. Métodos de Clasificación.....	47
3.4.3. Métodos de selección de variables.....	49
3.4.3.1. Análisis lineal discriminante por pasos (Stepwise Linear Discriminant Analysis, SLDA).....	49
3.4.3.2. SELECT.....	50
3.4.4. Técnicas de validación.....	50
3.5. <i>Diseño de experimentos</i>	51
3.5.1 Selección de los factores y del dominio experimental.....	52
3.5.2. Selección de las respuestas.....	52
3.5.3. Selección de la estrategia del diseño.....	54
3.5.4. Obtención y validación de los modelos matemáticos.....	57
3.5.5. Estudio de las superficies de respuesta.....	58
Capítulo 4. Desarrollo experimental	63
4.1. <i>Reactivos y productos</i>	65
4.1.1. Preparación de las soluciones lipídicas.....	65
4.2. <i>Métodos de preparativa de muestras</i>	65
4.2.1. Almacenamiento y manipulación de las muestras de plasma..	65
4.2.2. Extracción de lípidos de las muestras de plasma.....	65

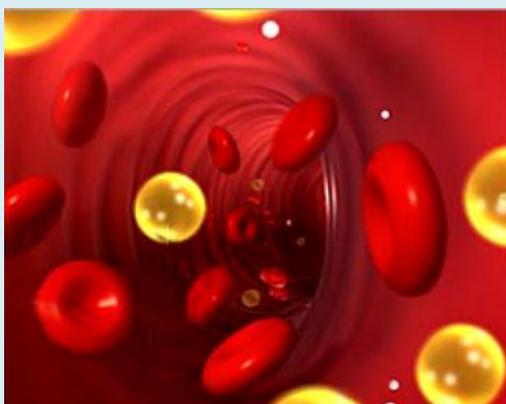
4.2.2.1. Extracción de lípidos con MTBE asistida con ultrasonidos.....	65
4.2.2.2. Extracción de lípidos con DCM asistida con Vortex (Método de Bligh-Dyer).....	66
4.2.2.3. Extracción de lípidos con MTBE asistida con Vortex....	67
4.3. <i>Métodos de análisis</i>	67
4.3.1. Análisis de muestras mediante FT-IR.....	67
4.3.2. Análisis de muestras mediante UPLC-MS.....	69
4.3.2.1. Análisis de datos e identificación de picos.....	70
4.4. <i>Software utilizado</i>	72
Capítulo 5. Resultados y discusión	75
5.1. <i>Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas</i>	77
5.1.1. Extracción asistida de lípidos de muestras biológicas.....	77
5.1.1.1. Introducción.....	77
5.1.1.2. Desarrollo experimental.....	78
5.1.1.3. Optimización de las condiciones de extracción lipídica aplicando Ultrasonidos.....	78
5.1.1.4. Evaluación del comportamiento en la extracción de las distintas familias de lípidos.....	83
5.1.1.5. Comparativa de los tres métodos de extracción evaluados: MTBE-US, DCM y MTBE-Vortex.....	91
5.1.1.6. Conclusiones.....	103
5.1.2. Conservación de muestras biológicas en laboratorios clínicos: Congelación-descongelación.....	105
5.1.2.1. Introducción.....	105
5.1.2.2. Desarrollo experimental.....	106
5.1.2.3. Diseño experimental: Evaluación de las condiciones de descongelación.....	106
5.1.2.4. Resultados y discusión.....	108

5.1.2.5. Comparación entre los distintos procesos de descongelación: Compuestos discriminantes de la descongelación por agua, aire y energía ultrasónica..	121
5.1.2.6. Conclusiones.....	133
<i>5.2. Análisis del perfil metabólico y lipidómico de pacientes con VIH y co-infectados con VHC mediante espectroscopía óptica y cromatografía líquida.....</i>	<i>135</i>
5.2.1. Discriminación de pacientes con diferentes evoluciones serológicas del VIH y de la co-infección con VHC utilizando huellas dactilares metabólicas obtenidas mediante FT-IR....	135
5.2.1.1. Introducción.....	135
5.2.1.2. Desarrollo experimental.....	139
5.2.1.3. Estudio de la población.....	139
5.2.1.4. Análisis de datos.....	139
5.2.1.5. Resultados y discusión.....	144
5.2.1.5.1. Perfiles espectrales FT-IR.....	144
5.2.1.5.2. Clasificación global: Enfoque de tres clases para discriminar pacientes con VIH, enfermedades avanzadas y sujetos control.....	146
5.2.1.5.3. Estratificación de enfermedades avanzadas: Enfoque de tres clases para discriminar pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC.	149
5.2.1.5.4. Selección del conjunto de longitudes de onda: Asignación de bandas e interpretación del significado bioquímico.....	152
5.2.1.5.4.1. Selección del conjunto de longitudes de onda: Asignación de bandas e interpretación del significado bioquímico.....	155
5.2.1.5.4.2. Bandas discriminantes entre las etapas avanzadas de la enfermedad.....	157
5.2.1.6. Conclusiones.....	158
5.2.2. Análisis lipidómico para descubrir y caracterizar potenciales biomarcadores en pacientes con diferentes etapas de infección por VIH y co-infección por VHC mediante UPLC-ESI-QTOF/MS.....	161
5.2.2.1. Introducción.....	161

5.2.2.2. Desarrollo experimental.....	163
5.2.2.3 Estudio de la población.....	163
5.2.2.4. Análisis de los datos e identificación de lípidos.....	163
5.2.2.5. Resultados y discusión.....	165
5.2.2.5.1. Caracterización lipidómica en pacientes con diferentes etapas de la infección por el VIH y VHC.....	165
5.2.2.5.2. Clasificación global por cromatografía: Enfoque que engloba tres categorías para discriminar a los pacientes con VIH, enfermedades avanzadas y sujetos control.....	165
5.2.2.5.3. Enfoque de clasificación definido por tres categorías con el fin de discriminar el grupo de pacientes con enfermedades avanzadas (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC) mediante perfiles cromatográficos.....	169
5.2.2.5.4. Análisis de las variables discriminantes como posibles biomarcadores.....	172
5.2.2.5.5. Interpretación biológica de las familias lipídicas asociadas al VIH y VHC.....	175
5.2.2.5.6. Potenciales biomarcadores lipídicos plasmáticas para el VIH y la co-infección con VHC.....	176
5.2.2.6. Conclusiones.....	179
Chapter 6. Conclusions.....	191
Capítulo 6. Conclusiones.....	195

CAPÍTULO 1

Introducción



El presente capítulo recoge la temática, así como las necesidades que han motivado el desarrollo de los trabajos de investigación incluidos en esta Tesis Doctoral.

Contenidos del capítulo:

- 1.1. *Disciplinas ómicas*
- 1.2. *Lipidómica*
- 1.3. *Acondicionamiento de la muestra: Desde la recolección hasta el análisis*
- 1.4. *Enfermedades inducidas por el VIH, el VHC y la co-infección por ambos virus*

1.1. Disciplinas ómicas

A partir del siglo XX, desde una perspectiva científica, se ha producido un cambio vertiginoso en el análisis de biomoléculas tanto de la especie humana como del resto de organismos vivos. Estos avances han permitido que se comience a tener una visión y una perspectiva del hombre desde un punto de vista genómico, no sólo como un conjunto de células y órganos, sino como una entidad que está compuesta por multitud de genes, de moléculas involucradas en el metabolismo celular, así como de componentes subcelulares que están implicados tanto en el correcto funcionamiento del organismo como en el deterioro del mismo al provocarse una alteración. Este tipo de perturbaciones conlleva la evolución de multitud de enfermedades ocasionadas tanto por errores hereditarios del metabolismo como por alteraciones del mismo.

Para poder comprender con más precisión y exactitud la importancia que tienen estos metabolitos tanto en las funciones esenciales como en el desarrollo de un organismo se ha definido una rama del conocimiento biológico con el nombre de ómica. Esta parte de la ciencia engloba a todas aquellas disciplinas, tecnologías y áreas de investigación que estudian un conjunto o la totalidad de los metabolitos involucrados en un sistema biológico. Dentro de esta rama ómica se pueden clasificar diferentes disciplinas dependiendo del componente biológico a estudio (Figura 1.1.1). Los nuevos campos de investigación más importantes se han definido como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica [1, 2], permitiendo profundizar en áreas más específicas, consiguiendo la determinación u obtención del perfil o perfilado molecular de los sistemas biológicos con el fin de conocer qué compuestos son los que caracterizan a los diferentes sistemas [3].

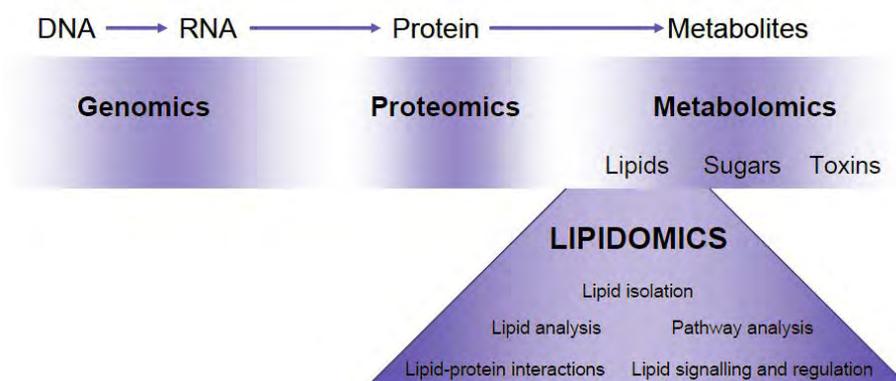


Figura 1.1.1. Esquema de las diferentes disciplinas ómicas.

En concreto, la metabolómica es la parte de la bioquímica analítica cuyo objetivo es el análisis y la cuantificación de los metabolitos con bajo peso molecular que están involucrados en las funciones biológicas de las células como pueden ser aminoácidos, azúcares, vitaminas y lípidos entre otros [4]. Al existir esta gran cantidad de familias de metabolitos, la metabolómica se ha

estructurado en diferentes subgrupos de análisis al potenciarse las investigaciones biomédicas, pudiéndose concentrar de forma exclusiva en las familias de azúcares y lípidos, emergiendo por esta causa las disciplinas de glicómica y lipidómica [5].

1.2. Lipidómica

La lipidómica es una parte de la metabolómica orientada al análisis comprensivo de los lípidos en los sistemas biológicos. Recientemente el perfilado lipídico, también denominado investigación lipidómica, ha despertado un creciente interés debido al reconocido papel que juegan los lípidos en numerosas enfermedades asociadas al desorden en el metabolismo de estos compuestos. La investigación bioquímica de los lípidos puede llegar a esclarecer el papel que juegan estos metabolitos tanto en la salud como en la comprensión de las patologías de enfermedades, la vigilancia de la respuesta de drogas en farmacología y toxicología, la medicina traslacional, así como conocer en profundidad los mecanismos de desciframiento de la enfermedad mediada por lípidos [6].

Los lípidos son componentes celulares esenciales que comprenden un gran número de especies moleculares químicamente distintas [7], presentando su estudio una enorme complejidad y especificidad, ya que engloban a un amplio conjunto de metabolitos. Según la diversidad química de los lípidos, éstos han sido clasificados en ocho categorías basándose en su estructura y complejidad biosintética: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, isoprenoides, glucolípidos y policéticos [8]. Los lípidos desempeñan muchos papeles importantes y esenciales en la fisiología de las células, los tejidos y los órganos, ya que forman parte de las membranas plasmáticas, además de desarrollar diferentes funciones biológicas incluyendo funciones estructurales, energéticas y reguladoras [6, 9].

A continuación, se van a describir los lípidos más destacados en el metabolismo del cuerpo humano según las funciones que desarrollan:

- **Ácidos grasos:** Biomoléculas formadas por una cadena carbonada de longitud variable, con un grupo carboxilo terminal (-COOH). Los ácidos grasos pueden ser saturados (compuestos químicos constituidos por una cadena de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces simples) o insaturados (compuestos químicos constituidos por una cadena de carbono que contiene algún doble enlace) (Figura 1.2.2). Los ácidos grasos son un tipo de lípido clave en la constitución de otros lípidos, formando parte esencial de los triglicéridos y los glucolípidos. Por otra parte, estos compuestos se caracterizan por ser la principal fuente de energía de las células.

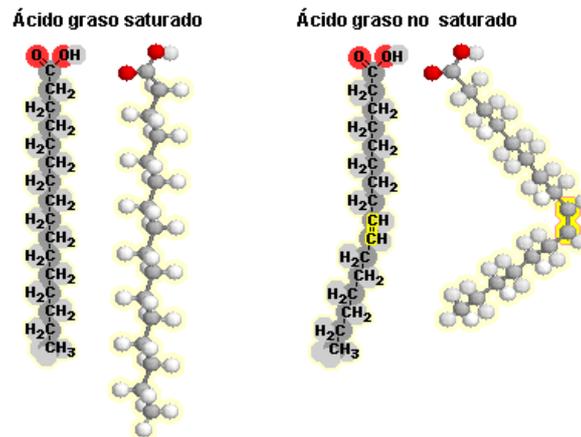


Figura 1.2.2. Estructura de los ácidos grasos.

- Triacilglicéridos: Estas biomoléculas están compuestas por triésteres de glicerol y por tres ácidos grasos, pudiéndose obtener estos elementos constituyentes a través de la reacción de hidrólisis (Figura 1.2.3). Los triacilglicéridos están formados por ácidos grasos procedentes de los alimentos y por los elaborados en el propio hígado. Estos triacilglicéridos pasan al torrente sanguíneo encapsulados por unas proteínas para facilitar su transporte llamando a este conjunto lipoproteínas. La función más relevante de esta familia de lípidos es la de proporcionar y almacenar energía para los distintos procesos celulares.

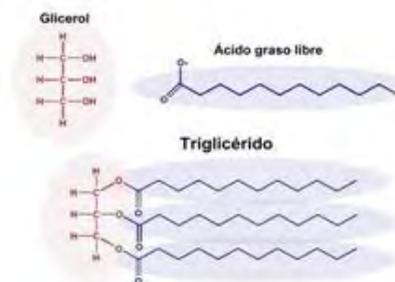


Figura 1.2.3. Estructura de los triacilglicéridos.

- Lípidos de membrana o lípidos complejos: En este grupo se encuentran englobadas varias familias de lípidos como son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol (Figura 1.2.4). Estos tres grupos de lípidos desarrollan funciones estructurales en las células, ya que se caracterizan por poseer una parte apolar o hidrófoba (posicionada en la parte interna de la membrana), mientras otra parte es hidrofílica (posicionada en contacto con el medio acuoso). Esta estructuración dentro de la membrana define en éstas las características de fluidez, transporte y señalización de las biomembranas.

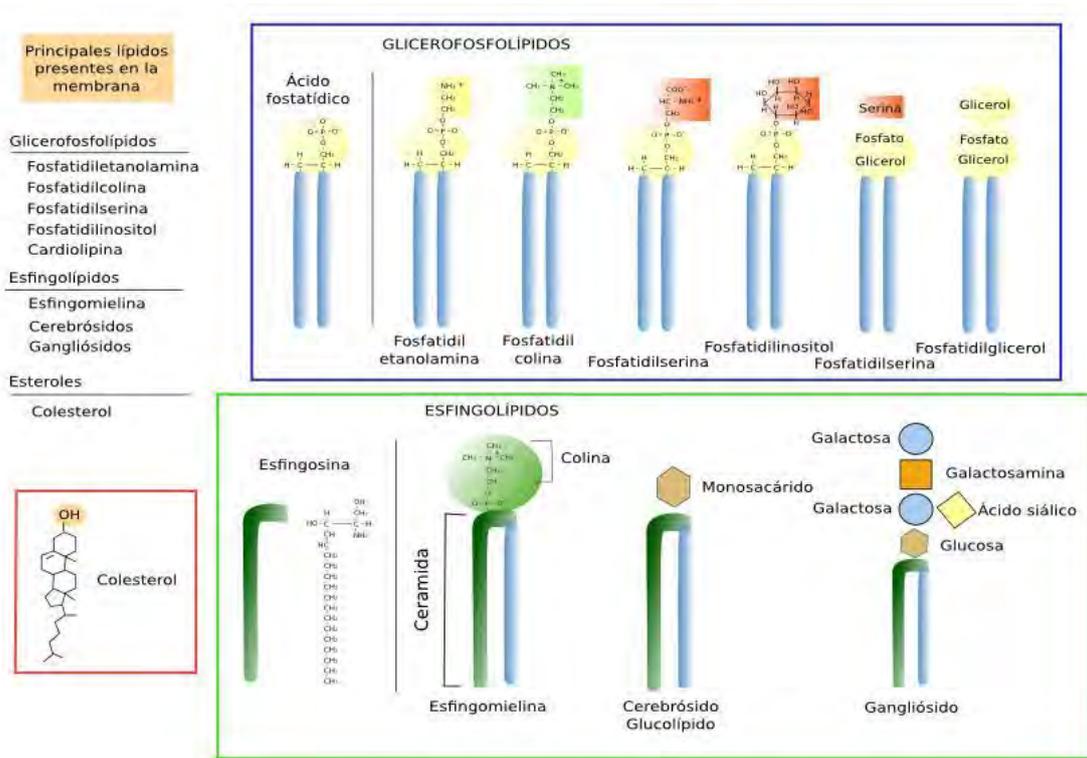


Figura 1.2.4. Estructura de los lípidos de membrana.

- Otros lípidos: En este grupo se incluyen las hormonas esteroideas y las vitaminas liposolubles A, D, E, K, siendo capaces todas ellas de determinar la función reguladora de las células (Figura 1.2.5).

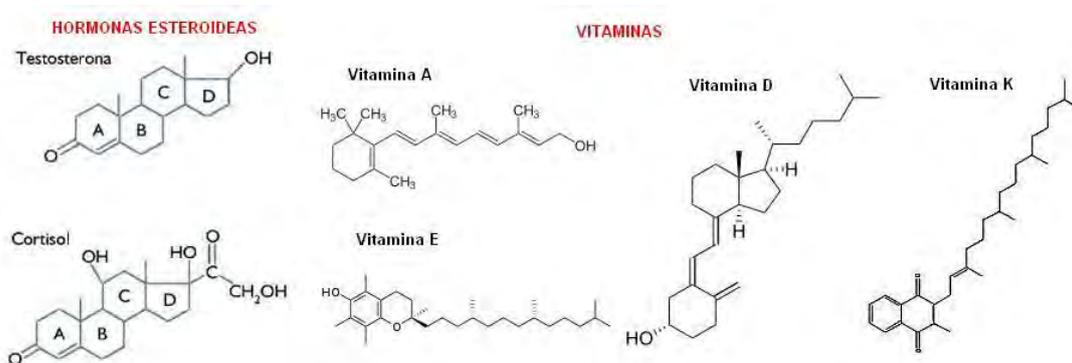


Figura 1.2.5. Estructura de otros lípidos.

Una vez se han descrito los lípidos más importantes del cuerpo humano, se debe de comentar la particular manera que tienen estos compuestos de transportarse por el torrente sanguíneo, ya que dependiendo de las propiedades que presentan las diferentes familias la agrupación de éstos con otros metabolitos va a variar. Los ácidos grasos formados por una cadena larga (C₁₂-C₂₀) son transportados por la sangre unidos en su mayor proporción a la proteína albumina, mientras que los ácidos grasos de cadena mediana (C₈-C₁₀) y corta (C₄-C₆) circulan libres en el plasma debido a que son hidrofílicos. Los triacilglicéridos, los fosfolípidos, el colesterol y sus ésteres, así como las

vitaminas liposolubles son transportados en complejos lipoproteicos hidrosolubles [10].

1.3. Acondicionamiento de la muestra: Desde la recolección hasta el análisis

Hay varias etapas fundamentales para la mayoría de los protocolos de diagnóstico clínico que influyen en los resultados (Figura 1.3.6). Estos procedimientos incluyen desde las fases de recolección de muestra y acondicionamiento de la misma, hasta las etapas de extracción de los analitos objeto de estudio, detección de los mismos y un post procesado de la información biológica adquirida.

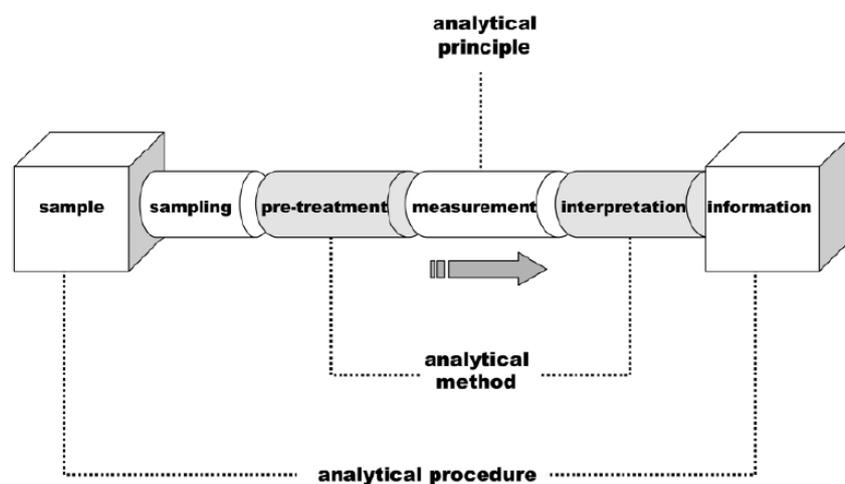


Figura 1.3.6. Diagrama de flujo para el análisis de muestras.

La primera etapa que se debe de tener en cuenta en un análisis clínico es determinar cómo se realiza el procedimiento de recolección de muestra, ya que incluso la técnica de detección más sofisticada no puede compensar la realización de un mal muestreo [11]. Las técnicas analíticas actuales no requieren el uso de grandes volúmenes de muestra, pudiéndose usar volúmenes pequeños del orden de micro o nanolitros. Este hecho hace que la muestra en esa pequeña cantidad tenga que ser una fracción representativa del sistema biológico que se quiere analizar. En el caso particular de las muestras clínicas, esa alícuota concreta debe de reflejar de manera precisa el estado fisiológico del paciente. Los procedimientos que son simples, reproducibles y ofrecen pocas posibilidades de exposición de la muestra a contaminantes son los más adecuados para la recolección de las muestras [12].

Una vez que se ha realizado la recogida de la muestra, normalmente ésta se debe someter a una etapa de conservación antes del análisis. En esta etapa, la muestra es guardada y almacenada en un lugar apropiado con unas

condiciones determinadas para evitar cualquier modificación hasta su posterior análisis [13].

El término pretratamiento de muestra o preparativa de muestra engloba un amplio rango de procesos que pueden ser aplicados a una muestra antes de que se lleve a cabo su análisis, es decir, son los procesos que se deben de realizar entre las etapas de recogida de muestra y su posterior análisis en plataformas analíticas. El objetivo principal de los pretratamientos es llegar a una solución donde el analito resultante esté presente en una forma que sea compatible con la técnica de detección [14]. Los procedimientos de pretratamiento pueden incluir la adición de un tampón, la adición de disolventes, la digestión enzimática, la centrifugación, la realización de diluciones, así como el tratamiento por calentamiento, enfriamiento, condensación o cualquier otra acción que sea necesaria realizar a la muestra para adecuarla en su utilización en los dispositivos de detección [15]. Se debe tener en cuenta que no existe una técnica de preparación de muestra biológica universal, ya que la preparación de muestra no depende sólo de sus características, sino también de la identidad del analito diana que se quiere analizar y del resto de componentes de la misma. Por esta razón, en estudios lipidómicos se debe prestar especial atención a las etapas que durante su realización pueden provocar o inducir una modificación, degradación u alteración de los lípidos, dando como resultados análisis inexactos por el cambio en estos compuestos. Estas alteraciones pueden producirse en la primera fase que se lleva a cabo en los laboratorios clínicos al iniciar el proceso de análisis a partir de muestras congeladas, ya que en la propia descongelación de la muestra se pueden desencadenar alteraciones en los niveles lipídicos, provocando la anulación y falsedad de los posteriores resultados obtenidos en el análisis de esa muestra.

En ocasiones, es necesaria la preconcentración de la muestra o el aislamiento de los compuestos diana del análisis. Esta etapa tiene como objetivo ajustar la concentración del analito para mejorar en gran medida las capacidades de detección de la técnica analítica. Hay que tener en cuenta que la cantidad de analito en la muestra no cambia al ser extraído, sino que la concentración aparente del analito sí que se ve aumentada al haber sido eliminado otra serie de compuestos que provocarían ruido y una mala detección. En los estudios de lípidos particularmente se debe de realizar, después de la descongelación de la muestra, la extracción de los mismos para conseguir la “purificación” y facilitar la detección de los lípidos. Como la mayoría de los lípidos son insolubles en agua, aunque algunos de ellos presentan también propiedades anfipáticas, es decir, que por una parte son hidrosolubles y por otra son liposolubles (están constituidos simultáneamente por un grupo polar y por un grupo no polar), requerirán el empleo de disolventes orgánicos para realizar la etapa de extracción [10]. En esta fase en

concreto, se llevan a cabo dos procesos simultáneos, el primero consiste en la extracción de los lípidos de la matriz de tejido y el segundo es la eliminación del extracto de cualquier contaminante no lipídico como pueden ser las proteínas mediante disolventes orgánicos. En la mayoría de los trabajos que se publican sobre lípidos esta etapa apenas se trata y se recurre a los métodos de “Folch” [16] y “Bligh y Dyer” [17], desarrollados hace más de cincuenta años, que se basan en el uso de mezclas de cloroformo y metanol. La mezcla cloroformo-metanol puede ser el mejor extractante para lípidos, sin embargo no es el más seguro ni apropiado desde un punto de vista ambiental y de la salud. Por ello, se han propuesto otros extractantes como las mezclas hexano-isopropanol [18] y acetato de etilo-etanol [19], pero su aplicabilidad para un amplio rango de tejidos no ha sido evaluada suficientemente.

Por todo lo mencionado anteriormente, hay que destacar que una de las fuentes más propensas de introducir errores en los estudios lipídicos y que debe prestarse especial atención son las etapas de preparativa de muestra al englobar una serie de procesos secuenciales hasta llegar al análisis.

El desarrollo que ha alcanzado hasta nuestros días la lipidómica ha sido gracias a los avances que se han producido en el campo experimental y a las investigaciones centradas en las diferentes plataformas analíticas. Concretamente, en los análisis de los lípidos es muy usual emplear la espectrometría de masas, ya que representa un papel clave en el estudio de la lipidómica [20, 21]. Las dos estrategias más importantes para el análisis de lípidos son, por un lado, la inyección directa de un extracto lipídico y la recogida del espectro de masas en un amplio intervalo de m/z (conocida como “shotgun lipidomics”) [21] y por otro, el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) [22]. Asimismo, se han propuesto algunas aplicaciones en lipidómica mediante MS o MS/MS [23, 24]. Si se emplea el espectrómetro de masas en modo MS se conseguirá obtener una alta exactitud y resolución en la determinación de las masas de los iones moleculares formados a partir de los distintos lípidos del extracto. Estos iones obtenidos se podrán identificar, aunque no permitirá diferenciar isómeros y lípidos con la misma fórmula química. Si, en cambio, el espectrómetro de masas se emplea en tándem (MS/MS), se podrán extraer barridos de iones precursores y barridos de pérdida de grupos neutros. Este conjunto de datos permitirá determinar la identidad de los distintos lípidos a partir de los grupos que los forman.

Aunque la espectrometría de masas (MS), es, sin duda, la técnica analítica más empleada en estudios metabolómicos [25], las técnicas espectroscópicas ópticas como el infrarrojo (IR) representan una interesante alternativa considerando su reconocido potencial como técnicas de huella (“fingerprinting”) molecular.

Estas dos plataformas permiten obtener y registrar una gran cantidad de información útil y relevante de muestras biológicas en forma de huellas metabólicas y lipídicas. Estas huellas se pueden tratar como señales registradas inespecíficas, es decir, a estas huellas dactilares se les puede aplicar técnicas de reconocimiento de pautas para intentar obtener las posibles perturbaciones metabólicas y lipídicas que puedan subyacer en ellas. Si estas huellas pertenecen o proceden de pacientes con una determinada patología, a partir del análisis y la aplicación de esta estrategia se podría obtener su diagnóstico clínico. Con unos buenos resultados logrados por esta estrategia, se podría desarrollar un método lo suficientemente específico como para aplicarlo de forma útil en el cribado de grandes poblaciones. Además, este tipo de estrategias suele proporcionar en la mayoría de los estudios metabólicos y lipídicos más de un biomarcador individual significativo proporcionando una adecuada especificidad de la patología estudiada.

Como se puede apreciar por la enorme cantidad de metabolitos, la naturaleza altamente multivariada de los datos metabólicos y lipídicos aportados por las técnicas analíticas basadas en sensores inespecíficos se traduce en unos datos con una gran dimensionalidad difícil de estudiar a priori. Para abordar esta problemática, se debe ineludiblemente aplicar sobre ellos técnicas quimiométricas con el fin de extraer la información relevante, así como afrontar y superar con éxito problemas asociados a los grandes conjuntos de datos multivariados (ruido, colinealidad, muestras anómalas...). Por esta razón, se debe tener en cuenta que para extraer el enorme potencial que proporcionan las investigaciones lipídicas se deben de aplicar potentes herramientas de análisis multivariado de datos [26, 27]. Este hecho concuerda con el objetivo de las investigaciones biomédicas que buscan el descubrimiento e identificación de potenciales biomarcadores de enfermedades, trastornos o alteraciones [7].

1.4. Enfermedades inducidas por el VIH, el VHC y la co-infección por ambos virus

Entre las enfermedades que desarrollan los seres humanos se encuentran las enfermedades virológicas, donde un agente patógeno externo al organismo se introduce en el mismo e induce una serie de cambios y alteraciones en el metabolismo. Una de las investigaciones que se ha convertido en uno de los mayores desafíos a nivel mundial de la salud pública es el estudio de las enfermedades generadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la Hepatitis C (VHC), debido a la gran cantidad de personas que se encuentran infectadas por estas patologías. Estas enfermedades han ocasionado una gran preocupación porque han alcanzado cifras significativas de morbilidad y mortalidad en el mundo [28, 29].

La infección inducida por el VIH es una de las principales causas de debilitamiento del sistema inmunológico del individuo infectado, permitiendo que los pacientes infectados puedan ser atacados por enfermedades oportunistas como el VHC. El VHC se caracteriza por desencadenar una evolución crónica provocando progresivas lesiones histológicas hepáticas, alcanzando una gran relevancia clínicamente por ser una de las causas de ingreso hospitalario y muerte en pacientes con VIH [30]. Cuando los pacientes son portadores de ambos virus, a estas personas se las denomina pacientes infectadas por la co-infección VIH/VHC. La coexistencia de la infección por VIH y VHC en un mismo individuo crea complejas interacciones, cambiando la evolución natural de ambas infecciones [31]. Esta co-infección permite tanto una progresión más rápida de la hepatitis, al no oponerse el sistema inmunitario del individuo a su desarrollo, como un avance más rápido en la evolución del VIH al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [32]. Por lo tanto, los pacientes co-infectados presentan un peor pronóstico que los pacientes que se encuentran exclusivamente mono-infectados por uno de los dos virus [33].

1.4.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El virus de la inmunodeficiencia humana es un retrovirus que pertenece a la familia de los Lentivirus, caracterizado por mostrar periodos de latencia clínica muy largos, pudiéndose manifestar la enfermedad tras varios meses o incluso años de infección. Durante estos periodos de latencia el virus no provoca ningún signo observable o señal de enfermedad en el individuo infectado [34]. La replicación de este tipo de virus es persistente en el tiempo, lo que hace que esta infección se traduzca en una enfermedad crónica y mortal.

Este tipo de virus tiene la capacidad de introducir su ARN (ácido ribonucleico) monocatenario, es decir, su información genética en las células humanas del sistema inmunitario, principalmente en células T y macrófagos. Para infectar estas células, el virus emplea la unión de su glicoproteína gp120 (glicoproteína superficial de la envoltura del VIH) con la proteína receptor CD4 (cúmulo de diferenciación 4) de la célula T que se encuentra en la superficie [35]. La partícula viral tiene forma esférica, con un diámetro de 80 a 100 nm, y una estructura de 3 capas: la interna está formada por un nucleoide en forma de cono truncado que contiene el ARN diploide, cuyos genes permiten la codificación de las proteínas del VIH para su replicación, la nucleoproteína y las enzimas víricas; una capa intermedia formada por una nucleocápside icosaédrica y una tercera capa exterior o envoltura, que está formada por 72 complejos glicoproteicos (Figura 1.4.7). Cada complejo proteínico posee una estructura de glicoproteína externa conocida como gp120 y una proteína transmembrana gp41 que actúan de unión entre el virus y la célula huésped.

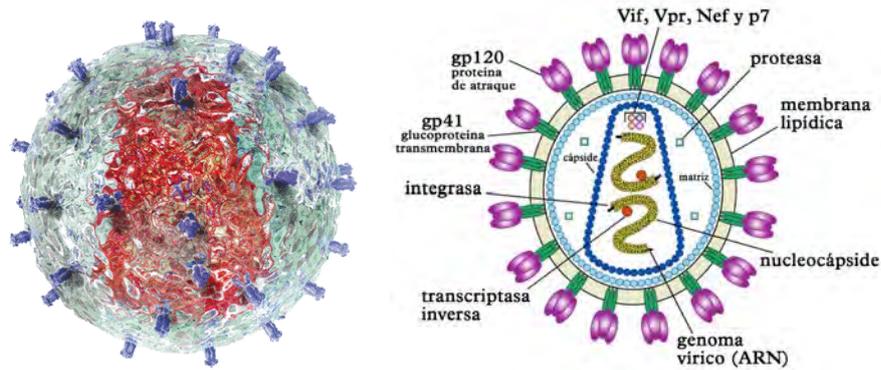


Figura 1.4.7. Estructura del VIH.

El ciclo de replicación del VIH se subdivide en varias etapas (Figura 1.4.8). Este proceso se inicia con una etapa de absorción, fusión e internalización del virión por el acoplamiento de las proteínas víricas con los receptos CD4 de los linfocitos-T y la posterior fusión entre la membrana plasmática de éstos y la membrana vírica. El virus libera su material genético dentro de la célula, haciendo que la célula a partir de este momento pueda producir tanto nuevas proteínas celulares como copias del virus VIH a partir de las instrucciones del ADN modificado por el virus. Esta célula puede estar infectada por el virus de forma latente, es decir, el virus permanece inactivo durante largos periodos de tiempo (periodos de latencia) sin producir nuevas copias de virus o produciendo muy pocas. La siguiente etapa transcurre cuando la célula huésped recibe una señal de activación, con la que se generan nuevas copias del VIH. Por último, se considera el desprendimiento del nuevo virus ensamblado en la célula, el cual se lleva consigo parte de la envoltura lipídica exterior de ésta, es decir, parte de la membrana celular. Combinaciones de proteínas y azúcares conocidas como glucoproteínas del VIH son introducidas en la nueva membrana vírica para servir como componente de acoplamiento de este nuevo virus al receptor CD4 de la siguiente célula huésped. De esta forma, nuevas copias del virus VIH ya están disponibles y listas para infectar al resto de células que presentan este tipo de receptores [36, 37].

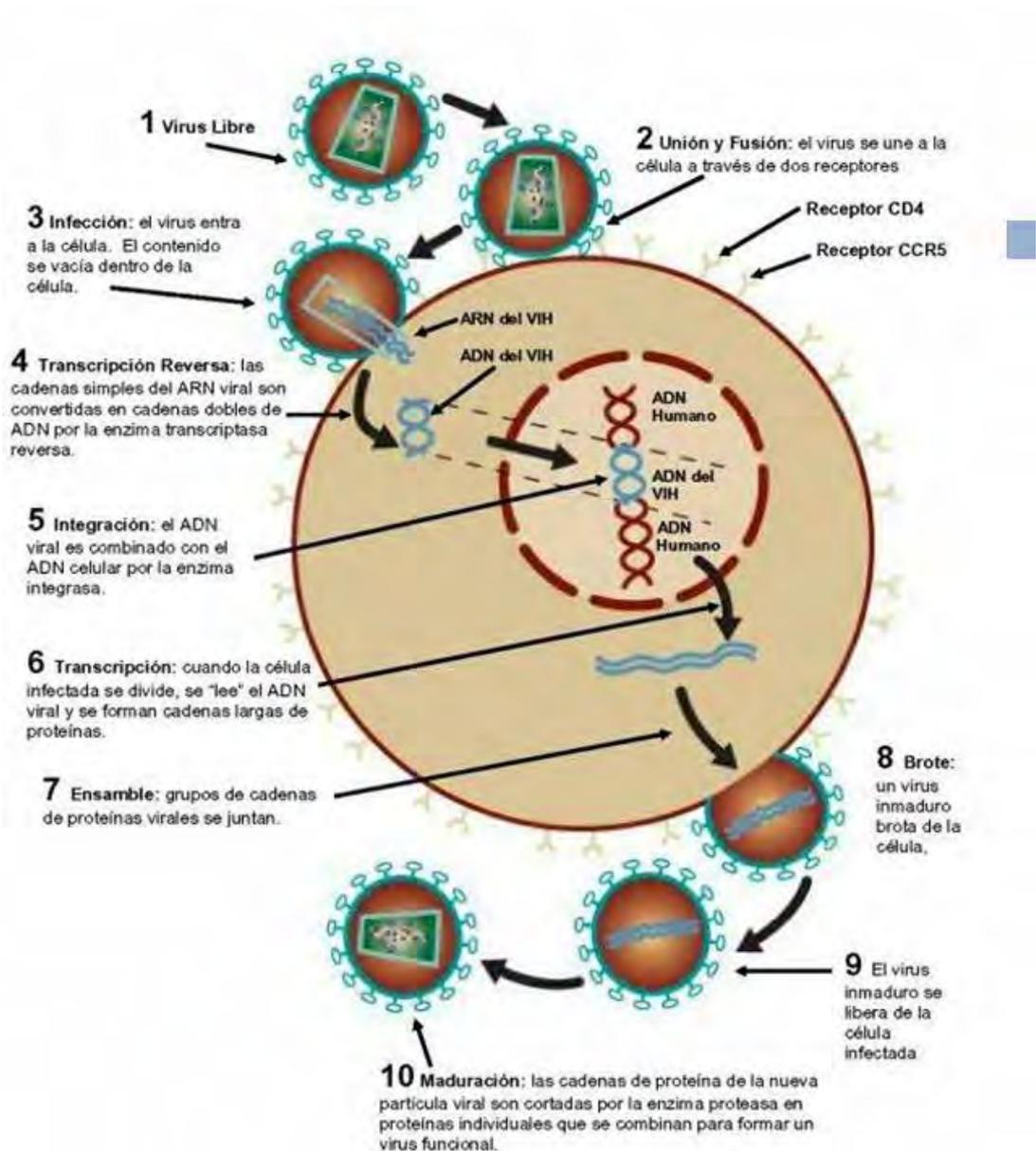


Figura 1.4.8. Ciclo de replicación del VIH.

La evolución de la infección por el VIH alcanza el SIDA como estado final. Esta etapa final se consigue con el deterioro gradual y persistente del sistema inmunitario, provocado por una disminución considerada y progresiva de las células T CD4+, presentando al organismo como un blanco factible para infecciones oportunistas por poseer el organismo un sistema inmunodepresivo.

Los pacientes infectados por el VIH presentan la enfermedad del SIDA cuando sus niveles de linfocitos están por debajo de $200 \text{ linfocitos/mm}^3$ [37]. Este bajo nivel de linfocitos indica la falta de defensas que posee el organismo, mostrando que el cuerpo está expuesto a una tasa elevada de replicación viral. Esta situación queda traducida por un descenso muy acusado en la actividad de los linfocitos, así como en la destrucción de la estructura linfática encargada de la respuesta inmunológica [38].

1.4.2. Virus de la Hepatitis C

El virus de la hepatitis C, VHC, es un tipo de virus que pertenece a la familia Flaviviridae y al género vírico Hepacivirus [39, 40]. La forma que presenta este virus es esférica, con un tamaño de 55-65 nm de diámetro [41]. El material genómico viral está protegido por una envoltura lipoproteica exterior y una nucleocápside icosaédrica en cuyo interior se encuentra el ARN monocatenario formado aproximadamente por 9.600 nucleótidos (Figura 1.4.9) [39].

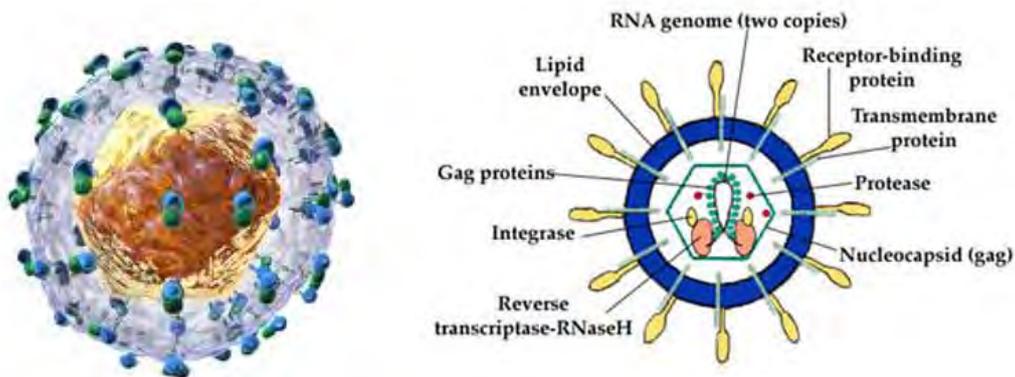


Figura 1.4.9. Estructura del VHC.

Este virus tiene la capacidad de introducir su única hebra de ARN vírico en las células humanas que constituyen el hígado, llamadas hepatocitos, aunque también se ha descubierto que es capaz de infectar tanto a monocitos como a linfocitos B [42, 43]. Para infectar a estas células, el virus emplea la unión de sus glicoproteínas con los receptos de estas células.

La replicación del VHC se produce en el citoplasma celular (Figura 1.4.10), de forma que el virus primeramente debe introducirse en la célula. La unión entre el virus y la célula huésped se puede llevar a cabo a través de las glicoproteínas de la envoltura viral con múltiples proteínas de la membrana celular [44]. Una vez que se ha producido la unión de estas proteínas, el virus VHC penetra en la célula huésped como una vesícula, pudiéndose presentar dos alternativas, que el virus permanezca en estado latente sin producción de nuevas partículas virales o que inicie su actividad para la replicación. En este segundo caso, la vesícula madura a endosoma produciendo la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal y la liberación del ARN viral al citoplasma celular para comenzar la replicación del ARN viral y el ensamblaje de los viriones. Cada nueva hebra de ARN viral será rodeada por una nucleocápside y a su vez ésta quedará rodeada por parte de la membrana plasmática de la célula que formará su envoltura. Como etapa final los nuevos viriones son liberados de la célula huésped al torrente sanguíneo [45, 46].

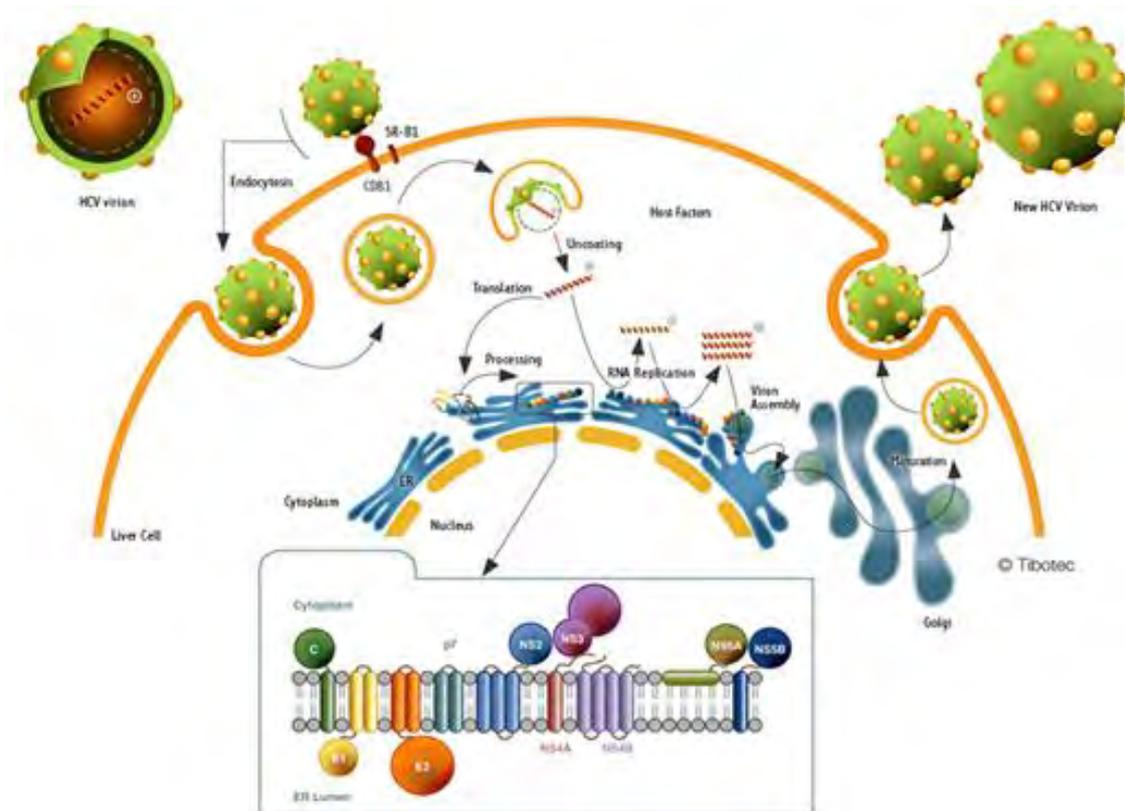


Figura 1.4.10. Ciclo de replicación del VHC.

1.4.3. Co-infección con VIH/VHC

Según varios estudios, en los países occidentales entre el 25-30% de las personas seropositivas padecen de forma concomitante la infección por VHC [47]. Ambos virus comparten las mismas rutas de infección, preferentemente vía sanguínea, condición que hace que sea frecuente la co-infección. Los pacientes que presentan la co-infección poseen una disminución acusada de linfocitos T CD4+ y una pérdida de respuesta inmune específica frente al VHC, provocando la cronicidad al VHC en el 80% de los pacientes. Hay que tener en cuenta que no sólo el VIH afecta al sistema inmune, ya que la infección del VHC tiene la capacidad de infectar a células linfoides como son las células dendríticas [42]. Por lo tanto, este hecho desencadena alteraciones en el sistema inmune y en la persistencia de la infección e inflamación hepática crónica.

La coexistencia de ambas infecciones provocadas por VIH y VHC en un mismo individuo desarrolla complejas interacciones, cambiando la historia natural de cada una de las infecciones. El VIH, debido a los efectos inmunosupresores que provoca, permite que los mecanismos de infección por VHC se desarrollen de manera más acelerada con respecto a la forma habitual que tendrían de llevar a cabo si se encontrasen con las barreras defensivas intactas de un organismo [47, 48]. Los pacientes co-infectados VIH/VHC presentan significativamente mayores niveles de carga viral del VHC, tanto en

plasma como en tejido hepático, que los pacientes VHC mono infectados, ya que la respuesta inmune específica frente al VHC se encuentra disminuida [33, 49]. Además, cuando la inmunodeficiencia asociada al VIH progresa, el VHC desarrolla con mayor celeridad una infección crónica en pacientes co-infectados VIH/VHC, dando como resultado cirrosis, enfermedades hepáticas descompensadas o carcinomas hepatocelulares [47, 48]. También cabe destacar que el virus de la hepatitis C podría actuar como co-factor en la progresión de la enfermedad causada por el VIH. La estimulación y activación de la respuesta inmune ocasionada por la infección crónica del VHC facilita la transcripción y replicación del VIH en los linfocitos T CD4+, provocando una destrucción más rápida de los mismos.

1.4.4. Alteraciones metabólicas inducidas por la medicación aplicada para combatir estas enfermedades

Tanto el VIH con el VHC requieren para su replicación metabolitos del organismo huésped, pero no son los únicos a los que se les asocia la alteración del metabolismo del organismo, ya que los fármacos aplicados para combatir estas enfermedades también tienen la capacidad de alterar estos niveles. De hecho, una de las enfermedades secundarias más comunes en pacientes tratados para combatir el VIH es la lipodistrofia, alteración en el metabolismo de los lípidos y distribución de los depósitos de grasa [50]. Esta enfermedad está asociada al uso de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA) que provoca la pérdida de grasa subcutánea en la cara, en las extremidades y en los glúteos para acumularla en la región abdominal, pectoral, así como dentro de los músculos y del propio hígado [50]. Este tipo de desequilibrios no son únicos de los lípidos, ya que este síndrome está acompañado de varias alteraciones metabólicas provocando hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares que disminuyen la calidad de vida de los pacientes y suponen, de alguna manera, una fuente de morbilidad aditiva a la inducida por el propio virus [51].

Referencias

- [1] Horgan, R.P., Kenny, L.C. „Omic” technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. (2011), 13, 189-195.
- [2] Zhang, W., Li, F., Nie, L. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: Application and methodologies. *Microbiology*. (2010), 156, 287-301.
- [3] Zierer, J., Menni, C., Kastenmuller, G., Spector, T.D. Integration of 'omics' data in aging research: From biomarkers to systems biology. *Aging Cell*. (2015), 14, 933-944.
- [4] Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M.J., Kaliszan, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2015), 113, 108-120.
- [5] Navas-Iglesias, N., Carrasco-Pancorbo, A., Cuadros-Rodríguez, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. (2009), 28, 393-403.
- [6] Muro, E., Atilla-Gokcumen, G.E., Eggert, U.S. Lipids in cell biology: How can we understand them better? *Molecular Biology of the Cell*. (2014), 25, 1819-1823.
- [7] Wenk, M.R. The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews. Drug Discovery*. (2005), 4, 594-610.
- [8] Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R., Shimizu, T., et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal Lipid Research*. (2009), 50 Suppl, S9-S14.
- [9] Hou, N.S., Taubert, S. Function and regulation of lipid biology in caenorhabditis elegans aging. *Frontiers in Physiology*. (2012), 3, 143.
- [10] Koolman, J., Röhm, K.-H. *Bioquímica humana. Texto y atlas*, Editorial Medica Panamericana, Madrid (2012).
- [11] Kalra, J. Medical errors: Impact on clinical laboratories and other critical areas. *Clinical Biochemistry*. (2004), 37, 1052-1062.
- [12] Vuckovic, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2012), 403, 1523-1548.

- [13] Bielohuby, M., Popp, S., Bidlingmaier, M. A guide for measurement of circulating metabolic hormones in rodents: Pitfalls during the pre-analytical phase. *Molecular Metabolism*. (2012), 1, 47-60.
- [14] Hyotylainen, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2009), 394, 743-758.
- [15] Lichtenberg, J., de Rooij, N.F., Verpoorte, E. Sample pretreatment on microfabricated devices. *Talanta*. (2002), 56, 233-266.
- [16] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. (1957), 226, 497-509.
- [17] Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (1959), 37, 911-917.
- [18] Hara, A., Radin, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. (1978), 90, 420-426.
- [19] Lin, J.H., Liu, L.Y., Yang, M.H., Lee, M.H. Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to folch reagent for extracting animal lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2004), 52, 4984-4986.
- [20] Ivanova, P.T., Milne, S.B., Myers, D.S., Brown, H.A. Lipidomics: A mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. *Current Opinion in Chemical Biology*. (2009), 13, 526-531.
- [21] Hu, C., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., Xu, G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2009), 877, 2836-2846.
- [22] Roberts, L.D., McCombie, G., Titman, C.M., Griffin, J.L. A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2008), 871, 174-181.
- [23] Farwanah, H., Wirtz, J., Kolter, T., Raith, K., Neubert, R.H., Sandhoff, K. Normal phase liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for separation, detection and mass spectrometric profiling of neutral sphingolipids and cholesterol. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2009), 877, 2976-2982.
- [24] Xu, F., Zou, L., Lin, Q., Ong, C.N. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and online databases for identification of phosphocholines

and lysophosphatidylcholines in human red blood cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. (2009), 23, 3243-3254.

[25] Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. (2007), 26, 51-78.

[26] Madsen, R., Lundstedt, T., Trygg, J. Chemometrics in metabolomics -- A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. (2010), 659, 23-33.

[27] Trygg, J., Holmes, E., Lundstedt, T. Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research*. (2007), 6, 469-479.

[28] Monga, H.K., Rodriguez-Barradas, M.C., Breaux, K., Khattak, K., Troisi, C.L., Velez, M., et al. Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*. (2001), 33, 240-247.

[29] Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. *The New England Journal of Medicine*. (1998), 338, 853-860.

[30] Weber, R., Sabin, C.A., Friis-Moller, N., Reiss, P., El-Sadr, W.M., Kirk, O., et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: The D:A:D study. *Archives of Internal Medicine*. (2006), 166, 1632-1641.

[31] Andreoni, M., Giacometti, A., Maida, I., Meraviglia, P., Ripamonti, D., Sarmati, L. HIV-HCV co-infection: Epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. (2012), 16, 1473-1483.

[32] Modjarrad, K., Vermund, S.H. Effect of treating co-infections on HIV-1 viral load: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*. (2010), 10, 455-463.

[33] Dutoit, V., Ciuffreda, D., Comte, D., Gonvers, J.-J., Pantaleo, G. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. *European Journal of Immunology*. (2005), 35, 3493-3504.

[34] Levy, J.A. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS*. (1993), 7, 1401-1410.

[35] Smith, J.A., Daniel, R. Following the path of the virus: The exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chemical Biology*. (2006), 1, 217-226.

- [36] Ao, Z., Yao, X., Cohen, É.A. Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *Journal of Virology*. (2004), 78, 3170-3177.
- [37] Gatell, J.M., Clotet Sala, B., Podzamczar Palter, D., Miró Meda, J.M., Mallolas Masferrer, J. *Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento*, Antares, Barcelona (2013).
- [38] Noda Albelo, A.L., Vidal Tallet, L.A., Pérez Lastre, J.E., Cañete Villafranca, R. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Revista Cubana de Medicina*. (2013), 52, 118-127.
- [39] Rosenberg, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus1. *Journal of Molecular Biology*. (2001), 313, 451-464.
- [40] Simmonds, P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*. (1999), 31, 54-60.
- [41] Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology*. (1994), 75, 1755-1760.
- [42] Bain, C., Inchauspé, G. Cellules dendritiques et virus de l'hépatite C. *Pathologie Biologie*. (2001), 49, 464-465.
- [43] Sung, V.M., Shimodaira, S., Doughty, A.L., Picchio, G.R., Can, H., Yen, T.S., et al. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: The apoptotic effects of virus infection. *Journal of Virology*. (2003), 77, 2134-2146.
- [44] Cocquerel, L., Voisset, C., Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry: Potential receptors and their biological functions. *The Journal of General Virology*. (2006), 87, 1075-1084.
- [45] Lohmann, V. Hepatitis C virus RNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. (2013), 369, 167-198.
- [46] Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., et al. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *The Journal of Biological Chemistry*. (2004), 279, 32035-32045.
- [47] Maier, I., Wu, G.Y. Hepatitis C and HIV co-infection: A review. *World Journal of Gastroenterology*. (2002), 8, 577-579.
- [48] Sierra, C.M., Arizcorreta, A., Dí, az, F., Roldá, R., Martí, et al. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with

hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*. (2003), 36, 491-498.

[49] Bonacini, M., Govindarajan, S., Blatt, L.M., Schmid, P., Conrad, A., Lindsay, K.L. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *Journal of Viral Hepatitis*. (1999), 6, 203-208.

[50] Huang-Doran, I., Sleight, A., Rochford, J.J., O'Rahilly, S., Savage, D.B. Lipodystrophy: Metabolic insights from a rare disorder. *The Journal of Endocrinology*. (2010), 207, 245-255.

[51] Mallon, P.W.G., Cooper, D.A., Carr, A. HIV-associated lipodystrophy. *HIV Medicine*. (2001), 2, 166-173.

CAPÍTULO 2

Justificación y objetivos



El presente capítulo recoge la justificación como los objetivos que se plantearon alcanzar al realizar la tesis doctoral.

La lipidómica es un campo emergente en la investigación biomédica, que tiene como objetivo el análisis de las diferentes especies lipídicas que componen los sistemas biológicos. Los estudios lipídicos proporcionan información sobre los papeles específicos que desarrollan estos metabolitos, permitiendo determinar cuáles de estos compuestos son potenciales indicadores de enfermedad. En este contexto, este tipo de estudios ha permitido avanzar en el análisis de enfermedades tales como la aterosclerosis, el cáncer o el Alzheimer, gracias a la implicación directa que estos metabolitos tienen en el desarrollo de estas patologías. La calidad de la muestra es esencial para generar conjuntos de datos lipidómicos de alta calidad, pero también se debe tener presente que las fases pre-analíticas son una parte crítica en el proceso analítico global. Estos tratamientos y adecuaciones de muestras se deben considerar como uno de los mayores retos que enfrentan a los profesionales de los distintos laboratorios por el empleo de diferentes metodologías. Los laboratorios deben de controlar las etapas que engloban la fase previa al análisis, ya que existen muchas fuentes potenciales que pueden generar resultados inexactos, llegándose a demostrar que entre el 60-80% de los errores inducidos en las pruebas de laboratorio se deben a la inadecuación y descontrol de las fases pre-analíticas empleadas. Este hecho hace prever que, si no se mantienen cuidadosamente las condiciones pre-analíticas óptimas, las interpretaciones biológicas de los datos recogidos se pueden ver comprometidas. Por esta razón, es necesario disponer de unos protocolos estandarizados y correctamente establecidos de las etapas pre-analíticas en la determinación del perfil lipídico de muestras de plasma, ya que este biofluido es una matriz ideal para el descubrimiento de biomarcadores.

Por este motivo, el objetivo general de esta tesis doctoral es proporcionar a los laboratorios clínicos una serie de protocolos y metodologías de las etapas pre-analíticas y de pretratamiento de muestra para la minimización del sesgo de errores que se puede introducir antes del análisis. Errores que se traducen en valores inexactos e incongruentes con la realidad de la muestra e irremediablemente asociado a un diagnóstico impreciso del organismo a estudio. Para lograr la eliminación de este tipo de errores es de vital importancia realizar análisis más exhaustivos y comprensivos de las etapas previas al análisis para obtener unos datos con mayor calidad. A su vez, este trabajo también pretende mostrar la idoneidad que presenta la combinación de métodos analíticos basados en técnicas de “huella dactilar” junto con herramientas quimiométricas para lograr la detección e identificación de marcadores de diferentes estadios de la misma enfermedad en personas que presentan un metabolismo tanto lipídico como metabólico alterado.

De esta forma, partiendo de la base de este objetivo global, se plantean la siguiente serie de objetivos específicos:

- Desarrollo de un método de extracción de lípidos de muestras plasmáticas mediante la combinación del disolvente extractor metil tert-butil éter junto con la aplicación de energía ultrasónica.
- Evaluación de los diferentes procesos de descongelación de muestras plasmáticas que se llevan a cabo en los laboratorios clínicos con el fin de analizar qué proceso afecta en menor medida en la degradación de las muestras biológicas.
- Desarrollo de un protocolo optimizado de descongelación que minimiza los tiempos de exposición de la muestra al proceso y permite obtener un mayor nivel de lípidos.
- Obtención de un perfilado metabólico mediante el empleo de métodos espectroscópicos inespecíficos como la espectroscopia de infrarrojo para la discriminación de pacientes que presentan enfermedades virológicas que son capaces de alterar dicho perfil.
- Obtención de un perfilado lipídico mediante el empleo de métodos cromatográficos inespecíficos como es la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas para la discriminación de pacientes que presentan enfermedades virológicas, al ser estas patologías capaces de alterar dicho perfil.
- Desarrollo de estrategias de clasificación fiables para la discriminación de pacientes con diferente evolución serológica de las enfermedades provocadas por el VIH y VHC en base a sus “huellas dactilares cromatográficas/espectroscópicas”.
- Aplicación de herramientas quimiométricas para la detección/identificación de marcadores de enfermedad en personas que presentan un metabolismo tanto lipídico como metabólico alterado.

CAPÍTULO 3

Fundamentos teóricos



El presente capítulo recoge la descripción de los métodos analíticos utilizados a lo largo de la tesis doctoral, la preparación de las muestras para el análisis y el material así como la instrumentación y software empleados.

Contenido del capítulo:

- 3.1. Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas*
- 3.2. Cromatografía líquida*
- 3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)*
- 3.4. Quimiometría y análisis de datos*
- 3.5. Diseño de experimentos*

3.1. Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas

Las etapas pre-analíticas y pretratamientos de las muestras son procesos muy importantes que deben ser realizados cuidadosamente, ya que tanto los posteriores análisis, como la interpretación biológica de los datos pueden verse comprometida al obtener unos resultados inexactos. Se sabe que el 60-80% de los errores más habituales que se producen en los laboratorios están asociados a este tipo de etapas [1].

3.1.1. Etapa pre-analítica congelación-descongelación: Conservación de muestras biológicas en laboratorios clínicos

La mayoría de las muestras biológicas, una vez que se ha realizado su recogida, son almacenadas aplicándolas un proceso de congelación. El objetivo de este proceso es mantener la viabilidad y funcionalidad de las muestras a temperaturas bajas durante periodos tanto cortos como largos de tiempo, llegando a alcanzar, incluso, décadas, intentando evitar que se produzcan reacciones adversas de los componentes de las muestras y que se conserven casi todas las propiedades y características originales que tienen antes de realizar este proceso de conservación. Con estas temperaturas de congelación no se permite a la muestra que experimente fenómenos de difusión u otros intercambios positivos de energía térmica para evitar que se lleven a cabo alteraciones de la composición química de la muestra. Por lo tanto, estas bajas temperaturas, que se encuentran en torno a $-70^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$, tienen potencialmente ciertas ventajas en cuanto a la conservación de las muestras biológicas [2].

Durante el proceso de congelación se producen diversos cambios fisicoquímicos en las disoluciones acuosas de las muestras biológicas. En un primer momento, se comienza con la formación de hielo cuando aproximadamente la temperatura disminuye por debajo de los -10°C ; el punto de congelación de una disolución depende de la cantidad de soluto que tenga presente la muestra, ya que está regulado por la propiedad coligativa denominada “descenso crioscópico”. Esta propiedad se caracteriza por un descenso en el punto de congelación de una mezcla al introducirse una cantidad de soluto con respecto al punto de congelación del disolvente puro. Por lo tanto, en esta fase se comienzan a formar los primeros centros de nucleación a partir de los cuales comenzarán a crecer posteriormente los cristales de hielo a una temperatura inferior al punto de congelación del agua. Estos cristales seguirán creciendo a medida que la temperatura disminuya formando frentes de congelación e incluyendo en su crecimiento a todos los solutos que encuentren a su paso [3].

En el proceso de descongelación se produce el efecto contrario al de congelación. En este proceso el agua congelada, en estado sólido, cambia de estado de agregación transformándose en líquida, con lo que se produce la liberación de los solutos que se encontraban inmovilizados en los cristales de hielo. Durante esta etapa, se deben de controlar las variables que están involucradas en este proceso, ya que un exceso de exposición de la muestra a un aumento de temperatura puede provocar cambios y alteraciones irreversibles en las muestras por la degradación de los analitos. Estos cambios provocarán la obtención de unos resultados poco fiables, ya que se han introducido modificaciones externas en la muestra en la etapa pre-analítica.

Para el análisis en plataformas analíticas tales como cromatografía líquida y espectroscopia óptica de matrices derivadas de la sangre, si el análisis no se lleva a cabo inmediatamente después de la recogida de la muestra, ésta se debe de congelar. Por esta razón, la congelación-descongelación es un paso clave para poder obtener unos datos ajustados a la realidad biológica del organismo a analizar [4]. Esta etapa es uno de los factores determinantes por el que se debe de realizar un protocolo de descongelación para poder realizar un óptimo análisis de cualquier perfil metabolómico que se quiera obtener [5].

Las técnicas de descongelación tienen que poseer unas características determinadas, ya que el proceso que llevan a cabo puede provocar alteraciones irreversibles en las muestras. El mantenimiento de la composición biológica de las muestras adjudica a estos procesos una importancia vital en la conservación de las características de las mismas [1]. Por esta razón, estas técnicas deben de llevar a cabo este proceso de una manera suave y efectiva para no dañar los componentes de las muestras durante el tiempo de exposición, reduciendo al mínimo posible su modificación.

Para comprender a fondo los cambios que se pueden producir durante la etapa de descongelación, se valorarán las distintas metodologías que se pueden emplear en el procedimiento de descongelación para conocer mejor cómo afectan cada una de ellas. Este análisis permitirá optimizar los parámetros controlables, tales como la instrumentación utilizada en la descongelación, la agitación introducida en la muestra, la temperatura de descongelación y el volumen de la muestra. Estos factores tienen una influencia directa en el tiempo de exposición de la muestra a estas condiciones [4, 5].

- Instrumentación empleada en la descongelación: En los laboratorios clínicos existe una amplia variedad de técnicas de descongelación, que difieren por el medio transmisor con el que se lleva a cabo el aporte de calor, así como por las temperaturas utilizadas o los instrumentos empleados para llevarla a cabo. De la elección y empleo de la técnica

idónea dependerá la calidad resultante que va a poseer la muestra. Los métodos de descongelación se pueden dividir en dos grupos:

- Los métodos que emplean la transferencia de calor por convección a través del contacto de la muestra con un fluido.
- Los métodos que introducen el aporte de energía como vibración de la muestra, ocasionando la ruptura de las uniones existentes entre partículas sólidas.

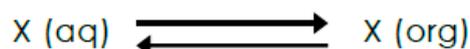
A su vez, esta clasificación de las técnicas de descongelación también se puede dividir según el medio que permite el intercambio de calor con la muestra, así como la incorporación de medios externos de homogeneización del proceso como puede ser la agitación de la misma. En los siguientes puntos se tratan estas diferencias:

- Descongelación por aire. El fenómeno termodinámico que subyace con este tipo de técnicas es la transferencia de calor a través de la convección entre los fluidos, pudiéndose realizar con convección natural o forzada. La convección natural es simplemente el intercambio de calor que ocurre entre un medio y el cuerpo a descongelar, mientras que en la convección forzada se proyecta aire sobre la muestra congelada.
- Descongelación por agua. En este tipo de técnicas se introduce la muestra, por inmersión, en un baño de agua donde se va a producir la transferencia de calor. En este tipo de métodos se produce el intercambio de calor entre el líquido y la muestra por convección de calor. La mayoría de las técnicas de descongelación con agua son notablemente más rápidas que los métodos de descongelación de aire, ya que los valores del coeficiente de transferencia de calor por convección son mayores en los líquidos que en los gases.
- Agitación de las muestras: En todas estas técnicas de descongelación (aire y agua) se puede aplicar la agitación de la muestra para que se produzca una mayor tasa de intercambio de calor, así como para evitar que se localice en el fondo del tubo de muestras el crioprecipitado [6]. Esta agitación también favorece la homogeneización de la muestra mientras se produce el cambio de estado.
- La temperatura es un factor primordial que debe ser analizada y fijada, ya que debe mantenerse constante durante todo el tiempo de descongelación. La importancia que tiene esta variable se fundamenta en la influencia que posee sobre los procesos degradativos, debido a la exposición de la muestra durante un tiempo prolongado a dichas temperaturas.

3.1.2. Extracción líquido-líquido

La extracción con disolvente se realiza para aislar componentes emulsionados o disueltos en una mezcla mediante el contacto directo con el disolvente apropiado, siendo el objetivo de esta técnica desplazar el analito presente en la matriz al disolvente. De esta forma, se consiguen disminuir las fuerzas intermoleculares existentes entre las moléculas de soluto y las fuerzas intermoleculares existentes entre las moléculas de disolvente, favoreciendo la formación de nuevas interacciones entre las partículas de soluto y del disolvente extractor. En las extracciones simples, el disolvente tiene que presentar una diferencia de solubilidad entre los compuestos de interés y el resto de componentes de la matriz junto con un apropiado coeficiente de difusión del disolvente para poder conseguir disolver el compuesto de estudio de la mezcla emulsionada [7].

Como se ha mencionado, el proceso de extracción líquido-líquido es un proceso de distribución de materia que se puede describir mediante el siguiente equilibrio químico:



Según este equilibrio, la constante de equilibrio de distribución del analito entre las dos fases permite calcular la extracción de los analitos de la muestra, siendo esta constante denominada coeficiente de reparto y calculada por la siguiente expresión:

$$K_D = \frac{[X]_{org}}{[X]_{aq}} \quad (1)$$

donde $[X]_{org}$ y $[X]_{aq}$ son las concentraciones del analito en la fase orgánica y en la fase acuosa, respectivamente. Sin embargo, la eficiencia de la extracción también está influenciada con el tiempo necesario para alcanzar dicho equilibrio, es decir, con la velocidad a la que se produce la transferencia de los analitos de una fase a otra.

Dado que la composición del plasma es aproximadamente de un 90% en agua, la adición de disolventes no polares dará como resultado la formación de una mezcla bifásica (fase polar y fase apolar). En la fase no polar se producirá la atracción y retención de los compuestos que presentan un comportamiento no polar, tales como los lípidos, ya que la hidrofobicidad de estos compuestos es el fundamento de la extracción de los mismos con disolventes no polares [8].

3.1.3. Extracción asistida por ultrasonidos

En general, el proceso de extracción puede acelerarse mediante la agitación de la mezcla que, además de ayudar a la rápida difusión de los analitos y transferencia de masa, provoca un aumento de la superficie de

contacto. Con el objetivo de desarrollar métodos cada vez más eficientes y a su vez simples y rápidos, se ha combinado la extracción líquido-líquido con el aporte de energía ultrasónica para reducir el tiempo de extracción de los analitos.

Los ultrasonidos se caracterizan por ser unas ondas acústicas cuya frecuencia se encuentra por encima del espectro auditivo del oído humano por esta razón son imperceptibles para los seres humanos (aproximadamente 20.000 Hz). Estas ondas son capaces de transmitirse por las sustancias independientemente del estado de agregación que presenten, es decir, ya sea sólido, líquido o gas siempre que el material por el que se quiere transmitir presenten propiedades elásticas. El movimiento vibratorio de las ondas ultrasónicas se propaga entre moléculas adyacentes desde el medio transmisor a la muestra al ir comunicándose entre ellas aportes de energía [9].

Los ultrasonidos favorecen la difusión de los analitos en cada una de las fases dando como resultado la homogenización de las soluciones. Esta técnica se puede llevar a cabo de manera focalizada introduciendo sondas directamente en la muestra, aunque generalmente, se suele emplear un baño de ultrasonidos para la transmisión de las ondas ultrasónicas en la muestra. Este proceso permite controlar la temperatura para evitar que se produzca la degradación de los compuestos de la muestra al introducirles un exceso de energía que se traduce en un aumento de temperatura [10].

3.2. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una de las técnicas analíticas encuadrada dentro de la cromatografía de elución y más utilizadas en el campo de la metabolómica, permite una separación de los metabolitos y poder obtener un perfil metabólico [11].

Pueden distinguirse tres tipos diferentes de cromatografía líquida en columna atendiendo al fundamento de la separación [12, 13]:

- Cromatografía de adsorción: se basa principalmente en las diferentes afinidades relativas que presentan los compuestos a analizar con respecto a la fase estacionaria, por lo tanto, la separación se lleva a cabo en repetidas etapas de adsorción-desorción. Normalmente el sólido absorbente suele ser sílica gel u otro empaquetamiento que contenga sílice.
- Cromatografía de intercambio iónico: se establece mediante la afinidad existente entre los iones de los analíticos con los iones de carga opuesta presentes en la fase estacionaria.
- Cromatografía de exclusión: se fundamenta en separar los componentes de una muestra de acuerdo a su tamaño y a la forma que poseen las

moléculas. En esta cromatografía se utiliza una fase estacionaria de material poroso donde los analitos quedarán retenidos, de modo que los analitos tardarán más o menos tiempo en eluir dependiendo del tamaño de su molécula de solvatación.

A su vez, la cromatografía de adsorción puede clasificarse en cromatografía de fase normal y cromatografía de fase reversa, dependiendo de la polaridad relativa de las fases.

- Cromatografía en fase normal: Se basa en el uso de una fase estacionaria fuertemente polar (sílice o alúmina) y una fase móvil no polar, de modo que los compuestos polares presentan fuerzas de adsorción más fuertes con la superficie polar del empaquetamiento de la columna y, por tanto, eluyen más lentamente, con lo que se consigue que aumenten sus tiempos de retención.
- Cromatografía en fase reversa: Se emplea para esta cromatografía una fase estacionaria de naturaleza no polar (cadenas hidrocarbonadas o grupos fenilo) y una fase móvil polar (generalmente mezclas de agua y un modificador polar). En este caso, los compuestos no polares serán fuertemente retenidos y, por lo tanto, los últimos en eluir.

Asimismo, la cromatografía líquida se puede separar según la composición de la fase móvil inyectada a la columna (fase que permite la elución de moléculas) en dos tipos: la isocrática o con gradiente. La elución isocrática se caracteriza por emplear una composición del eluyente constante a lo largo de todo el análisis, mientras que en la elución con gradiente la composición de la fase móvil (fuerza iónica, polaridad, etc.) va modificándose durante la separación [11]. La cromatografía líquida con gradiente permite obtener una mejor resolución de picos y reduce considerablemente los tiempos de retención.

Los elementos básicos de un cromatógrafo de líquidos son (Figura 3.2.1) [14]:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (depósitos de disolvente y bomba). En los recipientes de vidrio se depositan las fases móviles que van a ser absorbidas por la bomba para suministrar un caudal constante al cromatógrafo con el fin de permitir que fluya dicha fase móvil a través de la columna.
- Dispositivo de inyección (inyector). La misión del inyector es introducir un pequeño volumen de la muestra, del orden de unos pocos microlitros, en la columna. Para ello, los inyectores de jeringa deben de atravesar la membrana protectora del vial y absorber el pequeño volumen de la muestra para después inyectarlo sobre la cabeza de la columna.

- Conducciones y conexiones. Este grupo engloba todas las conducciones y conexiones presentes entre el inyector-columna y la columna-detector. Como este tipo de conexión simplemente tiene la misión de conectar las diferentes partes del cromatógrafo, éstas se caracterizan por poseer mínimas longitudes y diámetros pequeños para reducir el volumen que se queda almacenado en ellos.
- Columna. Es la parte más importante del cromatógrafo, ya que es el elemento donde se realiza la separación de los analitos. Existen en el mercado una amplia gama de materiales de relleno con el que están construidas (materiales que presentan diferentes afinidades con los elementos a eluir), así como por sus diferentes características geométricas (diámetros y longitudes).
- Detector y registrador. El detector es un dispositivo capaz de medir una propiedad física del eluyente a la salida de la columna. El tipo de detector se debe ajustar a la propiedad física que poseen los analitos que se quieren detectar, ya que sino los analitos pasarán desapercibidos para el detector. La señal ofrecida por el detector será recogida en el registrador, siendo esta parte del cromatógrafo la encargada de traducir la señal en los diferentes picos cromatográficos de los analitos. La suma de todos estos picos construyen los espectros mostrando la concentración existente de los analitos en la muestra por medio de la separación de los mismos según el tiempo de retención (tiempo que ha transcurrido desde que se introduce la muestra en la columna hasta que son detectados los distintos analitos por el detector).

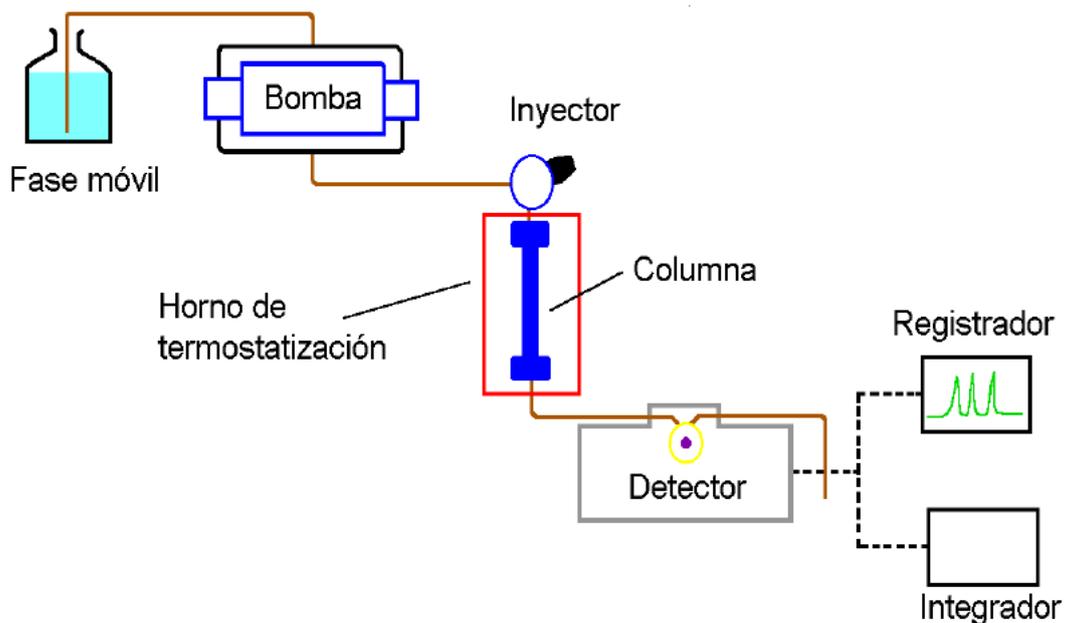


Figura 3.2.1. Partes básicas de un cromatógrafo líquido.

La cromatografía líquida se puede diferenciar según el tamaño de las partículas que componen la fase estacionaria (columna), siendo considerada cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cuando las partículas presentan un tamaño de hasta 3.5 μm o cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) cuando el tamaño de éstas es menor a 2 μm .

La cromatografía líquida de ultra-resolución (UHPLC) es considerada una avanzada técnica de cromatografía líquida, que se caracteriza por tener una mayor resolución cromatográfica en cuanto a la separación de los compuestos a analizar, una reducción en el consumo de disolventes, a una mayor velocidad de análisis, correspondiéndose con un menor tiempo de ejecución y una mayor sensibilidad en la detección.

Además, esta técnica cromatográfica ofrece la posibilidad de acoplar una fuente de ionización como medio para establecer una interfaz entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas. La combinación de la cromatografía con la espectrometría de masas proporciona tanto un alto poder de separación como una elevada sensibilidad y selectividad aportada por la técnica de detección [15].

3.2.1. Métodos de ionización LC-MS

El progreso y desarrollo de las técnicas de ionización acopladas a LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) ha sufrido grandes cambios estratégicos. Las primeras técnicas de ionización buscaban la eliminación de la fase móvil una vez que el efluente era transportado desde la columna cromatográfica hasta la fuente de iones del espectrómetro de masas. Para realizar este proceso, se propuso que estas ionizaciones llevaran a cabo la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas como portador activo de la muestra a presión atmosférica. Estas fuentes de ionización, por este motivo, son llamadas técnicas de ionización a presión atmosférica (API) y se caracterizan porque tanto la nebulización como la ionización se producen a dicha presión.

En este tipo de metodologías, los analitos son susceptibles de ser ionizados al encontrarse en fase gaseosa, gracias a la nebulización que ocurre tras la disrupción entre la fase líquida y el vapor que se forma. De esta manera, se intentó eliminar la fase móvil una vez que los analitos eran transferidos del líquido al estado gaseoso, pero se observó que la fase móvil no era una fase de arrastre, sino que era una parte esencial y fundamental en el proceso de ionización.

El desarrollo de las diferentes técnicas de ionización ha evolucionado con el paso del tiempo y los métodos más utilizados en los instrumentos LC-MS son las de ionización química a presión atmosférica, fotoionización a presión atmosférica e ionización por electrospray.

Cada una de estas ionizaciones tiene un principio de estimulación diferente que a continuación se comenta brevemente:

- La técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI) se fundamenta en la ionización química de las moléculas de la fase móvil, las cuáles actúan como gas reactivo una vez que han sido ionizadas por una descarga de electrones (Figura 3.2.2). Entre las moléculas de la fase móvil y los analitos se producen reacciones de transferencia, pudiéndose obtener de éstas moléculas de analito protonadas, desprotonadas e incluso aductos de la propia fase móvil.

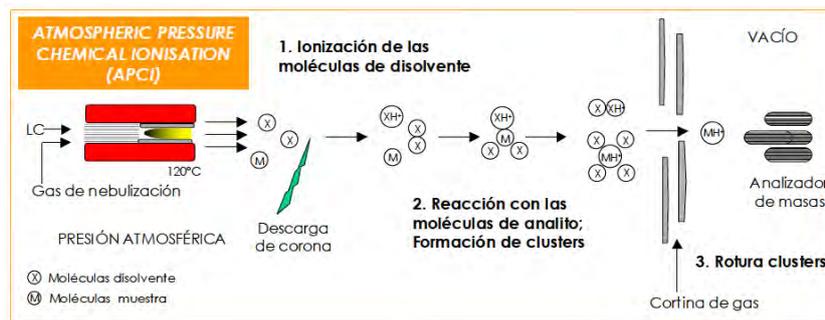


Figura 3.2.2. Técnica de ionización química a presión atmosférica.

- La fotoionización a presión atmosférica (APPI) se basa en el empleo de una lámpara ultravioleta y la absorción de un fotón generado por una descarga producida en dicha lámpara (Figura 3.2.3). Cuando se produce la fotoabsorción se origina la expulsión de electrones dando como resultado un catión que corresponde con un radical positivo $[M^+]$ [16].

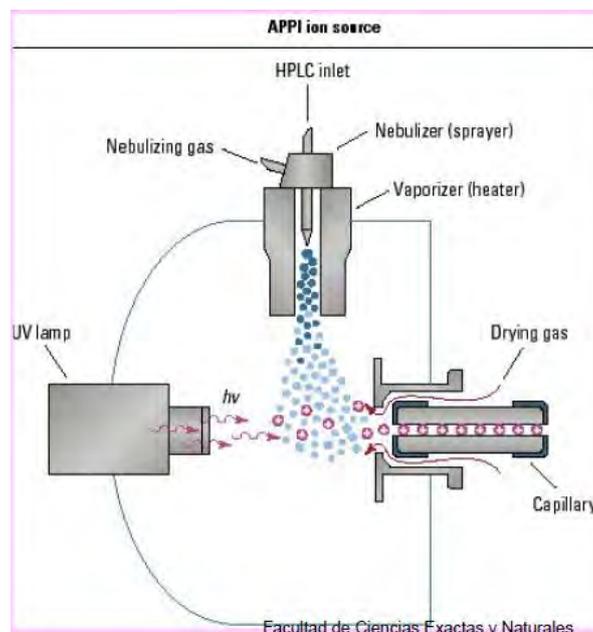


Figura 3.2.3. Técnica de fotoionización a presión atmosférica.

- La técnica de ionización por electro spray (ESI) se basa en la generación de una nube de diminutas gotas de analitos cargadas eléctricamente. La

muestra inicialmente se encuentra en solución con la fase móvil y es obligada a pasar a través de un capilar, donde se aplica un fuerte campo eléctrico, consiguiendo que a la salida del capilar la disolución se disperse en forma de spray (Figura 3.2.4). Este spray está formado por pequeñas gotas cargadas que se evaporan rápidamente porque su componente de fase móvil es volátil o por un proceso de desorción del campo eléctrico, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa [17, 18].

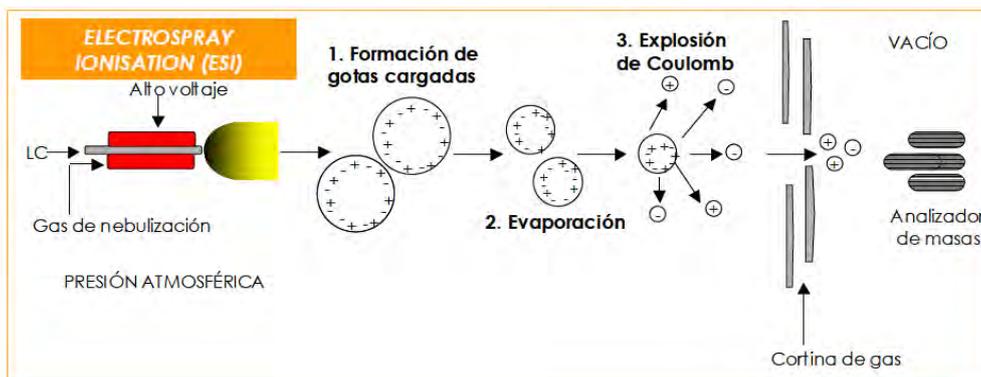


Figura 3.2.4. Técnica de fotoionización a presión atmosférica.

No existe una técnica de ionización que tenga la capacidad de ionizar de forma universal y que realmente el empleo de un método u otro de los citados en este texto va a depender de la masa molecular y la polaridad que presenten los analitos que se quieran analizar.

A día de hoy, las técnicas de ionización ESI y APCI son las más utilizadas como técnicas acopladas en los instrumentos LC-MS, ya que son fuentes de ionización capaces de trabajar en un rango amplio de masas. La ionización ESI suele ser más apropiada para compuestos muy polares o incluso iónicos, mientras que para los menos polares se ajustaría mejor la APCI.

3.2.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se fundamenta en la ionización y fragmentación de las moléculas en condiciones de elevado vacío, permitiendo obtener una serie de iones para facilitar su separación y detección (Figura 3.2.5). Por ello, este instrumento es capaz de separar los iones en fase gaseosa, que se han formado en la fuente de ionización, y genera a partir de ellos un espectro de masas, representando la intensidad relativa de los iones en función de su relación masa/carga (m/z). Los analizadores más relevantes son: cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FC-ICR) y orbitrap[19].

La combinación de detectores que se han empleado para desarrollar esta tesis ha sido: cuadrupolo y tiempo de vuelo (Q-TOF).



Figura 3.2.5. Flujo de trabajo empleado en la espectrometría de masas.

3.2.2.1. Analizador de cuadrupolo

La estructura de un cuadrupolo se configura colocando cuatro barras conductoras de forma paralela (Figura 3.2.6). A las barras situadas en posición enfrentada, es decir, opuesta se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). De esta forma, los iones que atraviesan las barras empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras, siendo repelidos y atraídos por las mismas, dependiendo directamente de la relación m/z que presentan cuando se les aplica un determinado potencial. Así, el cuadrupolo actúa como filtro de masas cuando se varía rápidamente el voltaje, permitiendo transferir al detector sólo los iones que posean una cierta relación m/z .

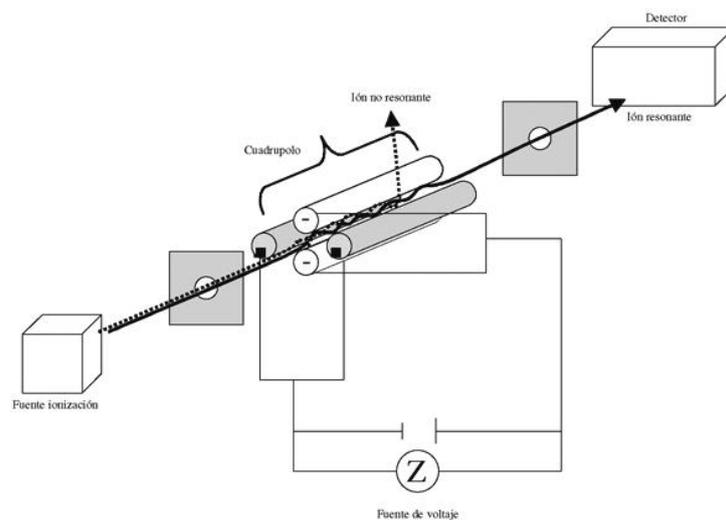


Figura 3.2.6. Esquema del funcionamiento de un cuadrupolo.

Una limitación que presenta el cuadrupolo es su baja sensibilidad en la modalidad de barrido completo, ya que si se realizan las medidas con un amplio rango de masas no todos los iones generados en la fuente de ionización van a alcanzar el detector.

3.2.2.2. Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

En el analizador de tiempo de vuelo los iones son acelerados a la salida de la fuente de ionización mediante un campo eléctrico, además son separados en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida hasta alcanzar el detector (Figura 3.2.7). Los iones adquieren una distribución de energía cinética proporcional a su relación m/z . Este analizador

trabaja mediante pulsos (modo discontinuo), ya que una vez que todos los iones de un han alcancen al detector se volverá a lanzar otro pulso de iones.

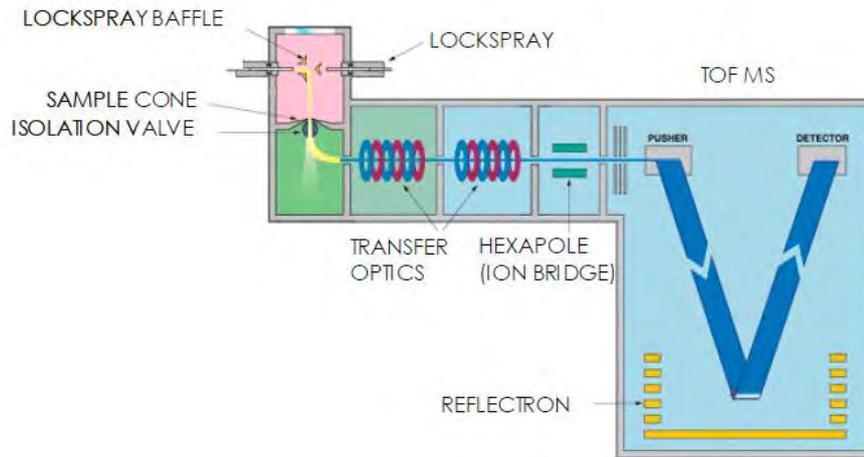


Figura 3.2.7. Esquema del funcionamiento de un cuadrupolo.

La elevada resolución obtenida con el TOF repercute en la posibilidad de obtener unas masas exactas de los iones detectados. Sin embargo, este instrumento presenta gran variabilidad con respecto a determinados parámetros como es la temperatura, por lo que hay que calibrarlo con ayuda de un compuesto de masa conocida (calibrante), que será ionizado y analizado, para corregir las masas de los analitos en función de la masa de este compuesto.

3.2.2.3. Analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF)

Este analizador constituye un híbrido entre dos analizadores, un cuadrupolo y un TOF. Este híbrido está constituido por un cuadrupolo, donde el cuarto cuadrupolo es sustituido por un analizador de tiempo de vuelo (Figura 3.2.8). Este analizador se fundamenta en la generación de series de iones producto debido a la fragmentación del ion precursor en la celda de colisión junto con la aceleración de éstos mediante el TOF.

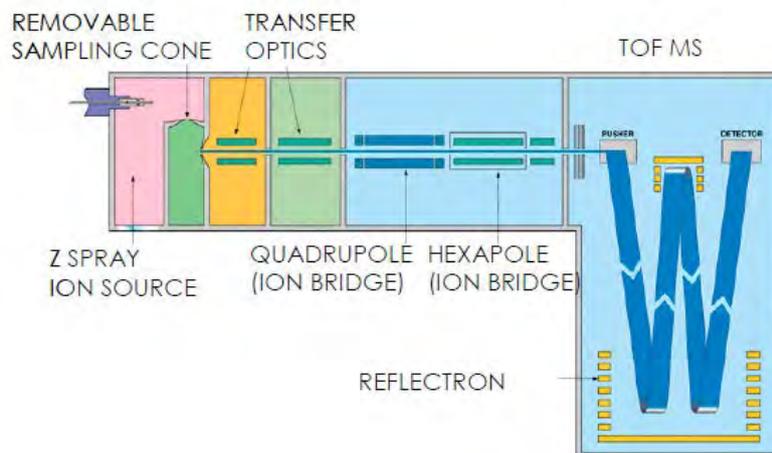


Figura 3.2.8. Esquema del funcionamiento de un híbrido Q-TOF.

Este analizador Q-TOF presenta ciertas ventajas en comparación con el resto de analizadores, siendo las más destacadas la elevada sensibilidad, el incremento en la velocidad de barrido y la alta resolución que presenta para poder determinar la masa exacta de los iones en el detector, pudiendo trabajar tanto en modo MS como en MS/MS (espectrometría de masas en tándem).

Para garantizar la calidad de las identificaciones de los compuestos se puede aumentar la sensibilidad mediante la combinación de varios analizadores o MS/MS, ya que en este último caso los iones precursores son conducidos a la celda de colisión donde se llevará a cabo la fragmentación de los mismos, dando como resultado una colección de iones producto [20]. Normalmente, la fuente de ionización ESI es un tipo de fuente muy blanda, es decir, genera un ión por cada analito ($[M-H]^+$, $[M-H]^-$...), permitiendo obtener mediante el modo MS información útil sobre la masa del compuesto y con MS/MS información estructural, ya que en este modo se produce la fragmentación del analito. Incluso, es posible aumentar el número de sucesivas aplicaciones, dando lugar MS^n , donde n es el número de veces que se efectúa la fragmentación de los iones analizados.

3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja (IR) tiene un papel fundamental en la investigación biomédica. La composición de los biofluidos está sujeta a variaciones a nivel molecular si se ven afectados por factores ambientales o alguna patología [21].

3.3.1. Fundamento de la espectroscopia infrarroja

La espectroscopia vibracional, especialmente la espectroscopia de absorción infrarroja es una de las técnicas espectroscópicas cuyo uso está más extendido. El espectro electromagnético de la región de IR abarca un rango de longitudes de onda de $10-12800\text{ cm}^{-1}$ y se divide en tres zonas: IR lejano (FIR) de $10-400\text{ cm}^{-1}$, IR medio (MIR) de $400-4000\text{ cm}^{-1}$ e IR cercano (NIR) de $4000-12800\text{ cm}^{-1}$.

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) es la más utilizada en el diagnóstico biomédico a pesar de que las absorciones que se obtienen en esta región espectral suelen ser débiles. Sin embargo, en la investigación presentada en esta tesis se trabaja con la región del infrarrojo medio (MIR), ya que actualmente se considera una técnica prometedora para el diagnóstico de patologías y permite la obtención de huellas metabólicas [21].

Los espectros infrarrojos se obtienen debido a que las moléculas poseen de forma natural unas frecuencias de rotación y vibración (modos normales de vibración). Cuando una molécula absorbe un fotón salta del estado

fundamental a uno excitado dando lugar a la vibración de la molécula. La frecuencia de la radiación debe coincidir con la de vibración de la molécula para que la transferencia de energía tenga lugar y se produzca la absorción.

Las vibraciones producen bandas de absorción que dependen del tipo de molécula, permitiendo identificar las diferentes moléculas a través del análisis de sus enlaces químicos. Una molécula lineal con N átomos tiene $3N-5$ modos de vibración, mientras que una molécula no lineal $3N-6$. La vibración puede ser debida a una vibración de tensión en la cual varían las distancias de enlace o a una vibración de flexión donde varían los ángulos de enlace [22].

3.3.2. Componentes instrumentales y funcionamiento de FT-IR

La espectroscopia FT-IR se desarrolló como una técnica que era capaz de superar las limitaciones que poseen los instrumentos dispersivos, aunque en sus comienzos esta técnica presentó como principal inconveniente en su aplicación el lento escaneo. Este inconveniente fue solucionado al adaptar y utilizar el interferómetro.

Los componentes instrumentales que forman el espectrofotómetro por transformada de Fourier son la fuente, el interferómetro de Michelson, el detector y el ordenador (Figura 3.3.9.).

El componente fundamental del FT-IR es el interferómetro de Michelson, que divide el haz de radiación lumínica que sale de la fuente en dos haces que son reflejados y que recorren caminos diferentes, uno se dirige a un espejo fijo y el otro a uno, para ser posteriormente recombinados y convergidos en un punto, dando lugar a una interferencia constructiva o destructiva dependiendo del espejo móvil.

El haz atraviesa la muestra, produciendo una absorción selectiva, para luego llegar al detector. La intensidad de señal que llega al detector da lugar al interferograma y a partir de éste mediante la aplicación de la transformada de Fourier se logra obtener el espectro de la muestra que se está analizando, es decir, se obtiene una señal que depende del número de onda a partir de una señal dependiente del tiempo [23].

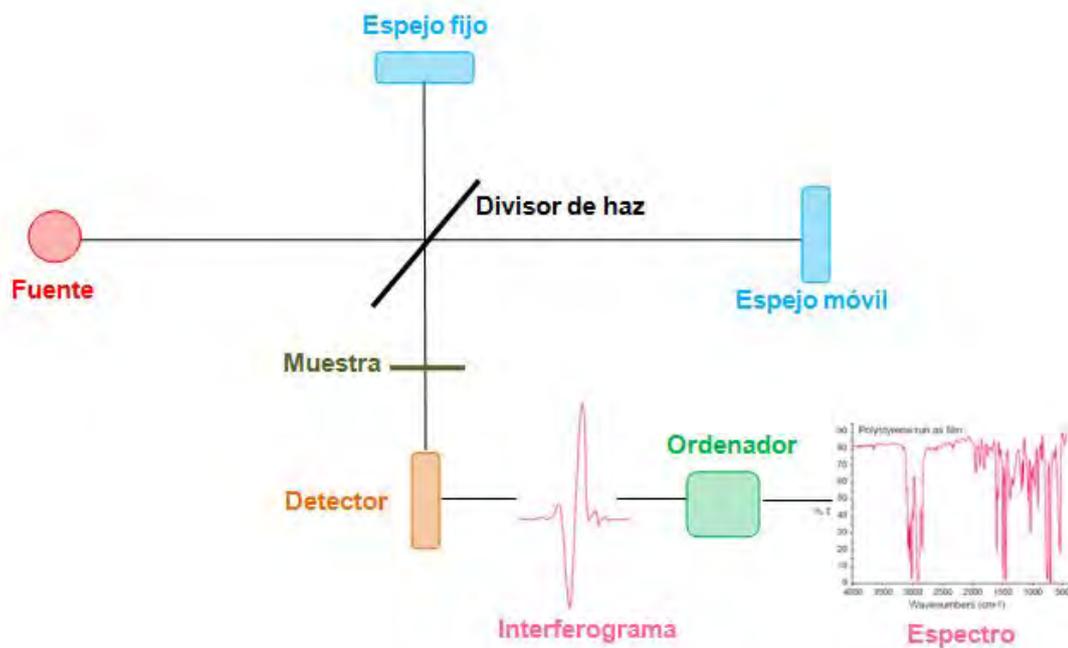


Figura 3.3.9. Diagrama simplificado de un espectrómetro por Transformada de Fourier.

3.3.3. Ventajas de FT-IR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier es una técnica analítica que se caracteriza por ser no destructiva y no necesitar preparación de muestra.

Además, los espectrofotómetros por transformada de Fourier presentan ventajas [22, 23] con respecto a los espectrofotómetros dispersivos, siendo éstas:

- Mayor rapidez en la medición. Todas las longitudes de onda son medidas a la vez.
- Mayor sensibilidad, ya que no se necesitan rendijas para limitar las frecuencias que llegan a la muestra y al detector.
- Mayor precisión al actuar el láser como fuente de calibración interna.
- Menor calentamiento de la muestra.
- No se observan contribuciones por emisión de la muestra en los espectros debido a que la muestra se encuentra después del interferómetro y antes del detector. Tampoco se detecta luz parásita.

3.4. Quimiometría y análisis de datos

La Asociación Internacional de Quimiometría (ICS) define la quimiometría como “*la ciencia que permite relacionar las medidas realizadas en un sistema químico o proceso con el estado del mismo mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos*”. Por esta razón, la quimiometría permite extraer la máxima información útil y relevante a partir de datos muestrales obtenidos de las distintas plataformas analíticas. Los avances que se han producido en la instrumentación química permiten obtener gran cantidad de información en forma de señales analíticas, requiriendo la necesidad de utilizar métodos avanzados de optimización, diseño de experimentos, calibración, clasificación y modelado... para procesar dicha información. En esta sección se recogen de forma breve las principales técnicas quimiométricas y estadísticas aplicadas para en el tratamiento de los datos espectroscópicos y cromatográficos generados en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

3.4.1. Métodos de pretratamiento de datos

La etapa de pretratamiento de los datos muestrales es un paso fundamental y que debe de ser realizado cuidadosamente antes de llevar a cabo cualquier cálculo, ya sea de clasificación o regresión.

La aplicación de técnicas de pretratamiento a señales espectroscópicas y cromatográficas permite minimizar variaciones en las condiciones de medida, ya que se pueden presentar fluctuaciones debido a cambios de temperatura, modificaciones en la longitud del camino óptico provocando una superposición de bandas. Estas variaciones también se pueden observar como dispersión o desplazamientos entre señales o como información irrelevante que está presente en los espectros o cromatogramas y que dificultan su análisis. Por lo tanto, los pretratamientos de datos deben de realizarse para construir modelos más simples y robustos y obtener una máxima fiabilidad en las conclusiones finales.

Esta rama de la química ha evolucionado en los últimos años presentando una infinidad de algoritmos y tratamientos de datos. En las siguientes líneas se van a describir brevemente los tratamientos que se han empleado en la elaboración de esta tesis doctoral.

3.4.1.1. Autoescalado

Este tratamiento consiste en realizar un centrado de columna para luego realizar una normalización, este algoritmo se expresa través de la siguiente expresión:

$$x'_{i,m} = \frac{x_{i,m} - \bar{x}_m}{s_m} \quad (2)$$

donde $x'_{i,m}$ es el dato autoescalado, $x_{i,m}$ es el dato original, \bar{x}_m es la media de la columna m y s_m la desviación estándar de la columna m . De esta forma, la media y la varianza de las nuevas variables autoescaladas es de 0 y 1, respectivamente [24].

3.4.1.2. Suavizado y cálculo de derivadas

Los espectros y los cromatogramas suelen incorporar información no relevante en forma de ruido aleatorio que puede ser reducido aplicando el pretratamiento del suavizado. La técnica más utilizada es la propuesta por Savitzky y Golay [25].

El uso de derivadas para el procesado de señales espectrales permite destacar características de la señal original, acentuando pequeños cambios de pendiente que son difíciles de apreciar en la señal adquirida. La primera derivada tiene la capacidad de corregir los desplazamientos de la línea base, mientras que la segunda derivada elimina el ruido de fondo lineal y constante.

3.4.1.3. Autoescalado de fila (SNV)

Este pretratamiento se emplea para eliminar las interferencias multiplicativas producidas por los efectos de difracción, por las diferencias en el tamaño de las partículas y por el índice de refracción de la muestra [26, 27].

$$x'_{i,m} = \frac{x_{i,m} - \bar{x}_i}{s_m} \quad (3)$$

donde $x'_{i,m}$ es la absorbancia autoescalada, $x_{i,m}$ es la absorbancia del espectro i a la longitud de onda m , \bar{x}_i es la absorbancia media del espectro i y s_m la desviación estándar de los valores de absorbancia de cada muestra.

Este pretratamiento centra y autoescala cada espectro de forma individual. Por lo tanto, cada espectro tratado de esta manera tiene media 0 y varianza igual a 1 y es, por tanto, independiente de los valores de absorbancia originales.

3.4.1.4. Corrección de la línea base

Las regiones donde no se perciben absorciones significativas (normalmente la intensidad de la señal toma un valor de cero) son denominadas línea base. La alteración de esta línea base puede deberse a múltiples factores tales como el alineamiento del divisor de haz, la purga del sistema, el tipo de accesorio, la preparativa de muestra, etc. El algoritmo de mínimos cuadrados ponderados (WLS) es un método muy empleado en el ajuste de la línea base tanto en datos cromatográficos como espectroscópicos. Este algoritmo determina de manera automática qué puntos proporcionan un mejor ajuste de la línea base por medio de una aproximación.

La sustracción de la línea base se debe de llevar a cabo mediante el ajuste a un polinomio de bajo orden, generalmente de orden dos. La selección del orden del polinomio se debe de hacer de forma cuidadosa, ya que el uso de polinomios con orden superior a dos pueden introducir variabilidad no deseada [28].

3.4.1.5. Alineamiento de señales cromatográficas

Para realizar un análisis de los datos cromatográficos como señales continuas es necesario que los picos correspondientes a un mismo compuesto no presenten ninguna variación en el tiempo de retención en los diferentes espectros o réplicas con el objetivo de poderlos comparar. Para solucionar este problema es necesario aplicar a los datos cromatográficos un pretratamiento de alineamiento.

Una de las técnicas más relevantes para la corrección del desplazamiento entre cromatogramas consiste en realizar desplazamientos con respecto a señales de los cromatogramas utilizadas como referencia interna.

3.4.2. Métodos de reconocimiento de patrón, clasificación y modelado

Uno de los problemas más importantes que se presenta en quimiometría es la identificación de las relaciones existentes entre objetos químicamente caracterizados. Para superar estas dificultades se emplean métodos de reconocimiento de patrón, de clasificación y de modelado de clases. Dentro de los métodos de reconocimiento de patrón existen dos modalidades [29], cuyo empleo va a depender del conocimiento que se tenga a priori del sistema a estudio. Si se tiene una serie de objetos que pertenecen a distintas categorías ya conocidas, será necesario establecer un modelo de clasificación que permita clasificar futuros objetos desconocidos dentro de alguna de las categorías aportadas por los objetos iniciales. En cambio, si no se tiene ninguna información de la categoría a la que pertenece ninguno de los objetos, se debe emplear una técnica de reconocimiento de patrón no supervisada para determinar una estructura común en el conjunto de los datos y encontrar entre ellos un comportamiento similar.

A continuación, se van a describir o desarrollar los métodos que se han utilizado en esta tesis doctoral para analizar los resultados biológicos aportados por las diferentes plataformas analíticas. De este modo, el análisis de componentes principales se describirá como método no supervisado y los métodos de clasificación tales como análisis discriminantes como método supervisado.

3.4.2.1. Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica multivariante que permite la reducción de la dimensionalidad y síntesis de la información mediante la generación de autovectores o componentes principales construidos a través de las combinaciones lineales de las variables analizadas, teniendo como requisito expresar el mayor porcentaje de la varianza total explicada.

De esta forma, se realiza una síntesis de los datos sin realizar ningún tipo de hipótesis ni categorización de éstos, ya que el conjunto de variables originales son transformadas linealmente y proyectadas sobre las direcciones de máxima varianza. Las nuevas variables se obtienen como una combinación lineal de las originales con la características que deben de ser ortogonales, es decir, no deben de estar correlacionadas. La construcción de las componentes principales se realiza de la siguiente manera: la primera componente principal es la combinación de variables de tal forma que su varianza sea máxima; la segunda componente principal se construirá teniendo en cuenta la combinación lineal de variables originales de varianza máxima y ortogonal a la primera componente; la tercera componente es, a su vez, otra combinación de máxima varianza con la propiedad de ser ortogonal a las dos primeras y así sucesivamente [30].

3.4.2.2. Métodos de Clasificación

Los métodos de clasificación se basan en el cálculo de un modelo a partir de un conjunto de muestras designado conjunto de calibración. Para realizar la construcción del modelo se agruparán las muestras que sean estadísticamente representativas de cada categoría definida. Este modelo tendrá la capacidad de discriminar entre la categoría estudiada y el resto del universo a través de una serie de variables predictoras con poder discriminante. Este hecho permite que con los métodos de clasificación se construyan modelos capaces de pronosticar la pertenencia de una muestra a una categoría o clase definida según las variables registradas.

En las investigaciones químicas se suelen utilizar diversos tipos de técnicas clasificatorias tales como el análisis discriminante, que puede ser lineal (LDA) [31] o cuadrático (QDA) [32], el método no paramétrico o método de los k vecinos más próximos “método k-NN” [33], máquinas de aprendizaje lineal [34] y los métodos de funciones potenciales [35].

A continuación, se describirán las técnicas de clasificación que han sido aplicadas en los estudios que conforman esta tesis doctoral.

Análisis lineal discriminante (LDA)

El análisis lineal discriminante se la primera técnica de clasificación multivariante introducida por R. A. Fisher en 1936. LDA se basa en un

algoritmo que construye vectores o funciones discriminantes mediante la combinación lineal de las variables originales denominadas variables canónicas, teniendo como objetivo dividir el espacio vectorial en regiones características para cada una de las categorías. Estas variables canónicas se construyen de forma que sean ortogonales, es decir, que no estén correlacionadas entre sí. Para ello, la hipótesis que establece el LDA es que la matriz de varianza-covarianza siga una distribución normal o Gaussiana igual para todas las clases o categorías [31]. Este análisis discriminante permite la minimización de la varianza intra-categorías y la maximización de la varianza inter-categorías.

LDA pertenece a las técnicas de clasificación probabilísticas, que tienen como fundamento teórico evaluar, para un determinado objeto, la probabilidad *a posteriori* de cada clase, es decir, la probabilidad de que un objeto x pertenezca a una clase dada c . La probabilidad *a posteriori* viene dada por la regla de Bayes:

$$p(c/x) = \frac{p(c)f(x/c)}{\sum_c p(c)f(x/c)} \quad (4)$$

donde $p(c)$ es la probabilidad *a priori* de la clase c ; $f(x/c)$ es la probabilidad *a posteriori* de x , es decir, la probabilidad de que bajo la condición de que esté en la clase sea c , X tenga el valor de x ; $p(c/x)$ es la probabilidad *a posteriori* de la clase, correspondiendo a la probabilidad de que cuando X tiene el valor de x , el objeto pertenece a la clase c . El denominador es un factor de normalización para obtener $\sum_c p(c/x) = 1$.

En algunas ocasiones no es posible conocer la probabilidad *a priori* de la clase, en cuyo caso se utiliza la regla de Bayes simplificada:

$$p(x/c) = \frac{f(x/c)}{\sum_c f(x/c)} \quad (5)$$

Análisis cuadrático discriminante (QDA)

Esta técnica de clasificación se basa en el mismo fundamento que el LDA, considerando que cada clase o categoría se establece con una distribución normal con diferentes medias, pero siendo la matriz de varianzas y covarianzas distintas para cada población, ya que las categorías tienen varianzas altas en unas direcciones y bajas en otras.

Por lo tanto, los delimitadores en este caso van a ser funciones curvilíneas, en vez de rectilíneas para la separación de las categorías. En los modelos con dos categorías las regiones serán delimitadas por curvas de probabilidad elíptica, mientras que si se analizan o emplean más categorías las curvas tendrán forma de elipsoide.

3.4.3. Métodos de selección de variables

La aplicación de estrategias de selección de variables es un requisito fundamental cuando se trabaja con extensas cantidades de datos porque logran reducir la dimensionalidad. A su vez, estas estrategias son capaces de eliminar tanto el problema de la multicolinealidad proporcionado por una fuerte correlación de las variables como la eliminación de las variables que no proporcionan información relevante, ya que los resultados pueden ser influenciados negativamente por este tipo de variables. Para ello, es necesario seleccionar las variables con mayor poder discriminante utilizando técnicas de selección de variables.

Las variables más significativas de una muestra pueden ser identificadas mediante el empleo de tres diferentes algoritmos, donde dos de ellos están basados en la F del test de Fisher [36]:

- Selección hacia delante (Forward): La selección de las variables se fundamenta respecto a un determinado criterio representado por un valor F de Fisher, las variables serán seleccionadas consecutivamente a partir del mayor valor de F que posean hasta conseguir agrupar todas las variables que superen el valor límite establecido.
- Selección hacia atrás (Backward): La selección de las variables se realiza de acuerdo a un modelo que previamente contiene a todas las variables y se van a ir eliminando progresivamente las variables que posean un valor de F inferior al fijado como valor límite establecido.
- Selección por pasos (Stepwise): Este método se caracteriza por seleccionar hacia delante, pero también tiene la posibilidad de eliminar alguna variable mediante la elección hacia atrás.

3.4.3.1. Análisis lineal discriminante por pasos (Stepwise Linear Discriminant Analysis, SLDA)

El análisis lineal discriminante por pasos se caracteriza por definir el poder discriminante de las variables a través de λ_{Wilks} [37]. El parámetro λ_{Wilks} se calcula como el cociente entre el determinante de la matriz de covarianza dentro de la categoría y el determinante de la matriz de covarianza de todo el conjunto de muestras. Por esta razón, el parámetro λ_{Wilks} se puede identificar como la relación inversa del ratio entre la varianza inter-categoría y la varianza intra-categoría, haciendo que cuanto menor sea el valor de λ_{Wilks} , mejor será la separación existente entre las categorías consideradas.

Este algoritmo selecciona las variables mediante la metodología de selección por pasos empleando la estrategia hacia delante. La primera variable seleccionada será aquella que presente un menor valor de λ_{Wilks} , mientras que,

en cada una de las posteriores etapas de selección, la variable que se seleccione será la que proporcione el mayor descenso en el valor de la λ_{Wilks} .

3.4.3.2. SELECT

SELECT (Stepwise orthogonalization of predictors) es un método de selección de variables que se puede aplicar tanto para poder abordar análisis multivariantes de clasificación como de calibración. SELECT se basa en la aplicación de un proceso de decorrelación por pasos (stepwise decorrelation), buscando la variable que presenta el valor máximo del coeficiente de correlación con una variable respuesta definida y . Al seleccionar esta variable, la decorrelaciones con respecto al resto de variables. Por lo tanto, las variables seleccionadas por SELECT poseerán un valor máximo en el peso de Fisher, valor que concuerda con un mayor poder discriminante entre categorías. El proceso de selección-decorrelación continúa hasta que se alcanza un número establecido de variables o hasta que el peso de Fisher sea menor que el valor de corte fijado [38].

3.4.4. Técnicas de validación

La validación de los métodos quimiométricos es una etapa esencial para establecer modelos de clasificación y predicción fiables con los datos analizados. La validación del modelo indica la capacidad predictiva que dicho modelo tiene para clasificar muestras que no han sido empleadas en la construcción del modelo. Para validar un modelo se deben organizar los datos en dos conjuntos, uno de ellos se denominará de entrenamiento (training set) y se empleará para construir el modelo, mientras que el segundo conjunto de muestras se denominará conjunto de evaluación (evaluation set) y se empleará para llevar a cabo la validación del modelo.

Los dos principales métodos empleados en la validación de modelos se diferencian en la manera de realizar el agrupamiento de las muestras, siendo denominados:

- Validación por conjunto de evaluación: El fundamento de este proceso consiste en establecer dos grupos de muestras, uno de entrenamiento y otro de evaluación. El modelo es creado a partir de las muestras de entrenamiento y es testeado por las muestras incluidas en el conjunto de evaluación. Este procedimiento es recomendado emplearlo cuando el número de muestras a analizar es elevado.
- Validación cruzada (cross-validation): El fundamento de este proceso de validación es ir construyendo sub-modelos creados a partir de diferentes conjuntos de muestras denominados grupos de cancelación. Cada vez que se calcula un modelo se deja un grupo de cancelación fuera, de modo que los objetos de este grupo se emplean como un conjunto de

evaluación para testar el modelo. La estrategia se repite de forma sucesiva dejando cada vez un grupo de cancelación diferente fuera del proceso de cálculo.

Si el número de grupos de cancelación es igual al número de muestras en el conjunto de entrenamiento, esta validación adquiere la denominación de full-cross-validation o leave-one-out cross-validation (LOO-CV) [39]. Para este caso particular, se van a construir tantos modelos como muestras analizadas se tengan, de forma que se generará un número elevado de interacciones, permitiendo obtener modelos con mayores capacidades de predicción, pero presentando como contrapartida un elevado tiempo de procesado.

3.5. Diseño de experimentos

En el desarrollo de nuevas metodologías analíticas como en los controles de procesos o sistemas se pretende con mayor frecuencia realizar la optimización de los parámetros o factores que influyen directamente con las respuestas. Hasta hace poco tiempo, el método tradicional que se empleaba para optimizar consistía en analizar cada uno de los factores que podían incidir en el proceso por separado. En cambio, en la actualidad el estudio de la optimización se ha ampliado al analizar los procesos a través de metodologías multivariantes, ya que también influyen en la respuesta las interacciones que tienen los factores. Para realizar este nuevo enfoque se debe de emplear una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas denominada Diseño de Experimentos. Esta metodología tiene como objetivo ayudar al investigador en la selección de la estrategia experimental óptima, a través de la evaluación de los factores con una serie de experimentos para obtener las condiciones óptimas en un umbral seleccionado previamente por el investigador. De esta forma, se consigue lograr una máxima fiabilidad y calidad en los modelos resultantes o en el proceso de experimentación.

Antes de construir un diseño de experimentos se debe de pensar cuál va a ser la finalidad de éste. En los diseños enfocados a la optimización de un proceso, la finalidad que busca el diseño de experimentos es determinar el conjunto de condiciones que deben de ser establecidas para obtener un producto o proceso con las características específicas deseadas. Para realizar esta optimización, generalmente se van a definir ciertas variables como factores, que tienen la capacidad de influir en la respuesta cuando son modificadas. Por esta razón, con el diseño de experimentos se va a ir variando el valor de los factores de manera controlada para poder comprobar su efecto o influencia en el proceso que se está estudiando y observar la influencia que tienen estas variaciones en las respuestas (características del producto o proceso a optimizar). Como se puede observar, en el diseño de experimentos existen dos tipos de variables, las respuestas y los factores, siendo las respuestas las variables dependientes, mientras que los factores son las

variables independientes. El modelo que relaciona la respuesta con el efecto de los factores se denomina función de respuesta, y si se tiene en cuenta el carácter multivariado del experimento son denominadas superficies de respuesta [40].

Los pasos o pautas a seguir para realizar un diseño de experimentos y llevar a cabo el análisis de los mismos de forma óptima se resumen a continuación:

- Selección tanto de los factores como del dominio experimental de cada uno de ellos.
- Selección de las respuestas.
- Selección de la estrategia del diseño.
- Determinación de las variables significativas e interacciones entre factores.
- Estudio de los resultados aportados por el diseño y selección del punto óptimo.

3.5.1. Selección de los factores y del dominio experimental

Los factores seleccionados en un diseño de experimentos pueden ser cuantitativos o cualitativos. Para poder seleccionar estos factores se deben de identificar las variables que afectan o tienen impacto significativo sobre el sistema, pudiéndose realizar esta selección mediante un screening. En este primer paso, se suele aplicar la preselección de variables relevantes en un proceso, siendo las matrices de Adamard el proceso más utilizado para este fin [40].

Una vez preseleccionados los factores significativos, es necesario definir las dimensiones del espacio experimental y delimitar los valores extremos que van a alcanzar los factores, permitiendo posteriormente que cada factor tome distintos valores denominados niveles, pero siempre acotados por el umbral previamente seleccionado.

3.5.2. Selección de las respuestas

Para la optimización de un proceso, un paso crucial en el diseño de experimentos es identificar las respuestas y conocer qué valores de los factores hacen que éstas tomen un valor máximo o mínimo. En la mayoría de los problemas reales que se plantean en un laboratorio, es común que exista más de una respuesta a optimizar, por lo que se debe llegar a una situación de compromiso entre las diferentes respuestas, pudiendo abordar y obtener soluciones robustas mediante los métodos de decisión multicriterio [36].

Para abordar esta estrategia de decisión multicriterio se ha elegido la teoría de las funciones de deseabilidad como el método aplicado en la presente tesis doctoral. Inicialmente, se deben de definir las funciones de deseabilidad de manera matemática para cada uno de los factores a analizar, siendo estas funciones de deseabilidad, d_k , el instrumento básico de esta estrategia. Las funciones de deseabilidad más comúnmente empleadas son de tipo lineal, exponencial, logarítmica, sigmoideal, escalonada, triangular y normal. Independientemente de la forma que posea la función de deseabilidad elegida, los valores que deberá tomar esta función van a estar comprendidos entre cero (no aceptable) y uno (deseabilidad máxima) [24].

Una vez definido el tipo de función y su comportamiento entre los límites establecidos para cada uno de los factores c , es decir, una vez que se han definido todas y cada una de las funciones simples de deseabilidad, se valorará la función de deseabilidad global D para cada una de las i muestras mediante la siguiente expresión matemática:

$$D_i = \sqrt[c]{d_{1i} \cdot d_{2i} \cdot \dots \cdot d_{ci}} \quad 0 \leq D_i \leq 1 \quad (6)$$

En el caso en el que se quieran introducir diferentes pesos, w_k , a las funciones de deseabilidad sencillas c , la función de deseabilidad global D_i toma la siguiente forma:

$$D_i = (d_{1i}^{w_1} \cdot d_{2i}^{w_2} \cdot \dots \cdot d_{ci}^{w_c})^{1/\sum w_k} \quad (7)$$

Teniendo en cuenta la forma final que posee la ecuación de la función D (media geométrica de las funciones simples de deseabilidad d_c), puede observarse que la función de deseabilidad global es muy restrictiva, ya que es suficiente con que una sola de las c funciones de deseabilidad sea nula para que el valor de la función D sea nulo. Asimismo, para que el valor de D sea igual a uno, es necesario que todas y cada una de las funciones de deseabilidad d_c sean máximas, es decir, iguales a 1. A través de las funciones individuales, el investigador introduce las especificaciones que debe cumplir cada respuesta y, a través de los pesos, la importancia relativa de cada una de esas respuestas. La función D global no es derivable; por ello, el proceso de optimización ha de llevarse a cabo a través de un método que no utilice derivadas como, por ejemplo, el método simplex o los algoritmos genéticos tal como el que utiliza Nemrod-W [41].

Según los valores obtenidos en la función de deseabilidad global D , esta función se puede clasificar en un determinado grado con respecto a los siguientes umbrales: excelente ($0.8 < D < 1$); buena ($0.63 < D < 0.8$); aceptable, pero mediocre ($0.37 < D < 0.63$); en el límite para ser aceptable ($0.20 < D < 0.37$); y no aceptable ($D < 0.20$) [37].

3.5.3. Selección de la estrategia del diseño

La selección del diseño experimental más adecuado depende principalmente del objetivo del estudio, del número de factores a estudiar y de las dimensiones de su espacio experimental. A continuación, se describe tanto el diseño central compuesto (CCD) como el diseño factorial completo, ya que estos dos diseños experimentales han sido aplicados en la elaboración de esta tesis doctoral.

Diseño factorial completo

Entre las estrategias que emplea el diseño de experimentos para averiguar la información deseada se establece el diseño factorial completo, 2^k . Este diseño es capaz de proporcionar información sobre qué experimentos son los más adecuados para conocer el efecto de los k factores a analizar sobre una respuesta, permitiendo averiguar la existencia de interacción entre éstos. Los experimentos que propone este método no consisten en ir variando los valores de un factor únicamente en una dirección, sino que plantea la variación de los factores de forma simultánea, imponiendo como restricción que cambien siempre en la misma dirección. El desarrollo de estos experimentos permite eliminar la correlación de los factores y evita la realización de experimentos en condiciones similares (redundantes). Con este tipo de diseño, se obtiene el menor número de experimentos que son necesarios realizar para extraer la máxima información, ya que los errores de las respuestas que presentan aleatoriedad se promedian, con lo que se consigue reducir tanto en coste de material como de tiempo de ejecución de experimentos.

En este diseño factorial completo, cada factor se analiza exclusivamente en dos niveles: “un nivel inferior designado por (-) y un nivel superior designado como (+)”, permitiendo la combinación de los dos niveles de cada uno de los factores con todos los niveles del resto de factores evaluados. De esta forma, se genera una matriz con 2^k filas y k columnas, que engloba a los k factores con sus dos niveles de manera alterna de la misma forma que se representa la información cuando se crean las tablas de la verdad en el álgebra booleana (Tabla 3.5.1). El primer factor presenta una frecuencia de alternancia de signo 2^0 , el segundo factor de 2^1 , el tercer factor de 2^2 , y así sucesivamente hasta el factor k que tendrá una frecuencia de alternancia de signo de 2^{k-1} .

Tabla 3.5.1. Matriz de experimentos elaborada para los diseños factoriales completos con 2, 3 y 4 factores.

	X_1	X_2		X_1	X_2	X_3		X_1	X_2	X_3	X_4
1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-	2	+	-	-	-
3	-	+	3	-	+	-	3	-	+	-	-
4	+	+	4	+	+	-	4	+	+	-	-
			5	-	-	+	5	-	-	+	-
			6	+	-	+	6	+	-	+	-
			7	-	+	+	7	-	+	+	-
			8	+	+	+	8	+	+	+	-
							9	-	-	-	+
							10	+	-	-	+
							11	-	+	-	+
							12	+	+	-	+
							13	-	-	+	+
							14	+	-	+	+
							15	-	+	+	+
							16	+	+	+	+

Diseño compuesto central (CCD)

Es uno de los diseños más empleados dentro del análisis de superficie de respuesta porque entre sus objetivos se encuentra no emplear un conjunto demasiado grande de experimentos, siendo evaluadas las respuestas según tres niveles diferentes: bajos, intermedios y altos, de forma que se evita la colinealidad entre las mismas.

Para la realización de este tipo de diseño se tiene que tener en cuenta que para k factores, el CCD se compone de varios grupos de experimentos:

- Se comienza analizando los experimentos de un diseño factorial completo, 2^k , o fraccional, 2^{k-r} , que se denominan N_F .
- Además, hay que tener en cuenta $2k$ experimentos de un diseño estrella o axial (dos experimentos que tienen en común cada uno de los factores y cuyo valor es opuesto, es decir, están posicionados en un eje y poseen $x_i = \pm \alpha$, siendo el resto de factores fijados en 0), que se denominan N_A .
- Por último, también hay que tener presente los N_0 puntos centrales, siendo elegido este valor de puntos centrales según las propiedades del diseño deseada.

A modo de ejemplo, para comprender mejor la información expuesta sobre el CCD en los puntos anteriores se representa la Figura 3.5.10, que plasma un diseño central compuesto para tres factores.

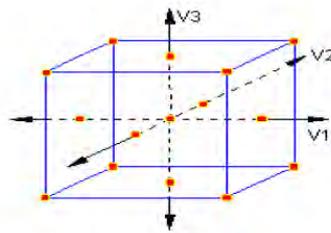


Figura 3.5.10. Diseño central compuesto para tres factores.

Este tipo de diseños presentan una serie de propiedades particulares que se deben de destacar:

- Rotabilidad: En los diseños CCD, para un valor determinado de α , la varianza de predicción de la respuesta solamente depende de la dirección en la cual se mueven los ejes desde dicho centro y de la distancia con respecto a éste. De esta forma, las curvas de isovarianza o las superficies son esféricas. Para cumplir este criterio de rotabilidad, el valor de α viene definido como:

$$\alpha = \sqrt[4]{N_F} \quad (8)$$

donde N_F es el número de experimentos definido en la parte factorial del diseño.

- Precisión uniforme: Este parámetro hace referencia a la incertidumbre tomada como un valor constante para todo el dominio experimental. Hay que tener en cuenta que una varianza de predicción constante a lo largo de todo el dominio en la práctica no es posible, pero sí que se puede considerar en una región media.
- Secuencialidad: Esta propiedad es una de las más importantes en este tipo de diseños porque permite realizar los experimentos en bloques de experimentación. Para realizar la distribución de los mismos, se debe de iniciar el análisis a partir de una matriz factorial fraccionada con puntos en el centro y determinar los efectos principales (creando el modelo de primer orden). Como segundo paso, se debe de completar con una segunda matriz factorial para poder determinar las interacciones que se producen, y, como punto final, se adicionan los puntos estrella (axiales) para poder determinar los términos cuadráticos. En la Tabla 3.5.2 se muestran de manera resumida la distribución del número de experimentos según los parámetros del diseño CCD para analizar entre 2 a 6 factores. El número de experimentos en el centro será definido por las condiciones y características que se desean evaluar, en términos de precisión u ortogonalidad, así como también de la matriz seleccionada [40].

Tabla 3.5.2. Resumen de los diseños CCD más empleados para 2-6 factores.

Nº Factores	2	3	4	5	6
Diseño Factorial	2^2	2^3	2^4	2^{5-1}	2^{6-1}
N_F	4	8	16	16	32
α	1.414	2.682	2	2	2.378
N_A	4	6	8	10	12
N_0 (nº óptimo para precisión uniforme)	5	6	7	5	9
N_0 (nº mínimo)	2-3	3	3-4	5	5

3.5.4. Obtención y validación de los modelos matemáticos

Tras la finalización del trabajo experimental, los resultados obtenidos como respuestas de cada uno de los experimentos deben de evaluarse. Los datos que se consiguen a partir de esta evaluación se ajustan a un modelo matemático que permite determinar el efecto que posee cada factor y las interacciones que tiene con los factores del proceso estudiado.

Estos modelos suelen ser calculados empleando el ajuste de la regresión lineal por mínimos cuadrados, empleando la siguiente expresión:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} X_{ij} \quad (10)$$

En esta expresión la Y corresponde a la respuesta, mientras los X_i son los factores que se han estudiado y b_i o b_{ij} coeficientes.

Tras obtener los modelos que expresan la dependencia de la respuesta con respecto a los factores analizados, éstos deben de ser validados para corroborar y validar esta dependencia. Para llevar a cabo este proceso de validación se pueden emplear dos procedimientos distintos: un análisis de varianza o un análisis a través de puntos test.

- El primer método (análisis de la varianza ANOVA) permite verificar si el modelo que se ha seleccionado se ajusta al comportamiento de los factores y si sus parámetros son significativos. De esta forma, se evalúa si los valores de los parámetros obtenidos son proporcionados por la existencia de errores experimentales o factores inciertos a través del cálculo de la desviación de éstos.
- Para realizar el análisis a través de puntos test es necesario realizar una serie de experimentos adicionales. Estos experimentos son diferentes de las réplicas que se pueden realizar de los experimentos propuestos por el diseño. Estos nuevos experimentos, denominados puntos test, permiten comparar los valores que se obtienen en el laboratorio con los valores que predice el modelo sobre éstos, para evaluar si el modelo tiene capacidad predictiva sobre estos experimentos.

3.5.5. Estudio de las superficies de respuesta

Para analizar una variable dependiente de varios factores de un experimento se requiere analizar las superficies de respuestas propuestas con los datos del modelo. Este estudio proporciona información relevante sobre cómo condiciona la dependencia de las combinaciones de los factores sobre la respuesta estudiada. El análisis de estas curvas entre cosas permite identificar y seleccionar cuáles son las condiciones para alcanzar una maximización o minimización de la respuesta [42].

Estas superficies de respuestas se pueden representar tanto en dos como en tres dimensiones. Los gráficos de dos dimensiones muestran las variaciones que se producen en la respuesta con respecto a dos factores que son colocados en los ejes de coordenadas. Las gráficas en dos dimensiones se construyen como la proyección de la superficie tridimensional sobre el plano X_1X_2 de los gráficos de tres dimensiones.

Los gráficos de tres dimensiones permiten realizar una mayor interpretación de las respuestas (Figura 3.5.11), ya que cada uno de los ejes de coordenadas representa un factor con sus niveles y la forma y altura que describe la superficie de respuesta conforme a éstos se puede observar de manera más concisa. Para ayudar en su interpretación, en estas gráficas, se pueden dibujar unas líneas de contorno correspondientes a valores constantes de la respuesta.

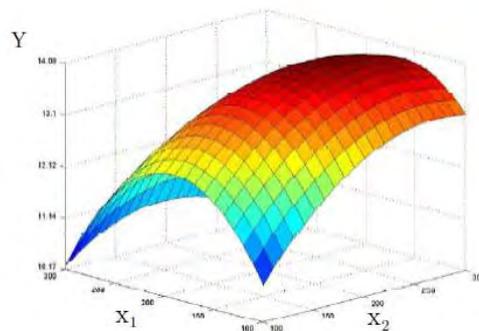


Figura 3.5.11. Superficie de respuesta representada por un gráfico tridimensional.

Referencias

- [1] Yin, P., Peter, A., Franken, H., Zhao, X., Neukamm, S.S., Rosenbaum, L., et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clinical Chemistry*. (2013), 59, 833-845.
- [2] Tuck, M.K., Chan, D.W., Chia, D., Godwin, A.K., Grizzle, W.E., Krueger, K.E., et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: Early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *Journal of Proteome Research*. (2009), 8, 113-117.
- [3] Steponkus, P.L. *Advances in low-temperature biology*, Elsevier, London, England (1996).
- [4] Yang, S., McGookey, M., Wang, Y., Cataland, S.R., Wu, H.M. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *American Journal of Clinical Pathology*. (2015), 143, 558-565.
- [5] Pizarro, C., Arenzana-Ramila, I., Perez-del-Notario, N., Perez-Matute, P., Gonzalez-Saiz, J.M. Thawing as a critical pre-analytical step in the lipidomic profiling of plasma samples: New standardized protocol. *Analytica Chimica Acta*. (2016), 912, 1-9.
- [6] Sparrow, R.L., Greening, D.W., Simpson, R.J. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma. *Methods in Molecular Biology*. (2011), 728, 259-265.
- [7] Bailey, P.S., Bailey, C.A. *Organic chemistry: A brief survey of concepts and applications, 6th Ed.*, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ (2000).
- [8] Shuler, M.L., Kargi, F., DeLisa, M. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 3rd Ed.*, Prentice-Hall, Inc., Upper saddle River, NJ (2017).
- [9] Priego Capote, F., Luque de Castro, M.D. *Analytical applications of ultrasound, volume 26. Part I. Ultrasound and sample preparation, 1st Ed.*, Elsevier Science, Amsterdam (2006).
- [10] Agranat, B.A., Dubrovin, M.N., Javski, N.N., Eskin, G.I. *Fundamentos de la física y la técnica de los ultrasonidos*, Mir, Moscú (1990).
- [11] Tolstikov, V.V., Fiehn, O., Tanaka, N. Application of liquid chromatography-mass spectrometry analysis in metabolomics: Reversed-phase monolithic capillary chromatography and hydrophilic chromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. (2007), 358, 141-155.

[12] Sadek, P.C. *Troubleshooting HPLC systems: A bench manual* A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (2000).

[13] Sawadesh, J. *HPLC: Practical and industrial applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1997).

[14] Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S.J., Imam, S.S., Hafeez, A. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - A review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. (2015), 2, 1056.

[15] Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography. A*. (2012), 1259, 3-15.

[16] Robb, D.B., Covey, T.R., Bruins, A.P. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. (2000), 72, 3653-3659.

[17] Banerjee, S., Mazumdar, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. (2012), 2012, 40.

[18] Iribarne, J.V., Thomson, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*. (1976), 64, 2287-2294.

[19] Dass, C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA (2007).

[20] Sleno, L., Volmer, D.A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. (2004), 39, 1091-1112.

[21] Wang, L., Mizaikoff, B. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2008), 391, 1641-1654.

[22] Griffiths, P.R., De Haseth, J.A. *Fourier transform infrared spectrometry*, John Wiley & Sons, (2007).

[23] Nicolet, T. *Introduction to Fourier transform infrared spectrometry*, Thermo Nicolet Corporation, (2001).

[24] Todeschini, R. Introduzione alla chemiometria. *EdiSES, Napoles*. (1998), 321.

[25] Savitzky, A., Golay, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*. (1964), 36, 1627-1639.

[26] Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*. (1989), 43, 772-777.

[27] Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. Correction to the description of standard normal variate (SNV) and de-trend (DT) transformations in practical spectroscopy with applications in food and beverage analysis—2nd Edition. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. (1993), 1, 185-186.

[28] Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J., Windig, W., Koch, R.S. *PLS Toolbox 4.0 for use with MATLAB™* Eigenvector Research Incorporated, Wenatchee, WA, USA (2007).

[29] Mongay Fernández, C. *Quimiometría*, Universidad de Valencia (2005).

[30] Zou, H., Hastie, T., Tibshirani, R. Sparse principal component analysis. *Journal of computational and graphical statistics*. (2006), 15, 265-286.

[31] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte, Y., Kaufman, L. *Data handling in science and technology, volume 2. Chemometrics: A textbook.*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1988).

[32] Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*, NIR Publications, Chichester UK (2002).

[33] Forina, M., Lantieri, S., Armanino, C., Cerrato-Oliveros, C. *User's manual of VPARVUS 2003: An extendable package of programs for data explorative analysis, classification and regression analysis*, Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari, Genova, Italy (2003).

[34] Nilsson, N.J. *Linear learning machines*, McGraw-Hill, New York (1965).

[35] Coomans, D., Broeckaert, I. *Potential pattern recognition in chemical and medical decision making*, Research Studies Press, Letchworth (1986).

[36] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., Jong, S.D., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1997).

[37] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., Jong, S.D., Lewi, P.L., Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998).

[38] Forina, M., Lanteri, S., Casale, M., Cerrato Oliveros, M.C. Stepwise orthogonalization of predictors in classification and regression techniques: An

“old” technique revisited. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. (2007), 87, 252-261.

[39] Stone, M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. (1974), 36, 111-147.

[40] Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. *Pharmaceutical experimental design*, Marcel Dekker Inc., New York (1999).

[41] Mathieu, D., Nony, J., Phan-Tan-Luu, R. *NEMROD-W 2001*. LPRAI, Marseille (2000).

[42] Cornell, J.A. *Experiments with mixtures: Designs, models, and the analysis of mixture data*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA (2011).

CAPÍTULO 4

Desarrollo experimental



El presente capítulo recoge la descripción de los métodos analíticos utilizados a lo largo de la tesis doctoral, la preparación de las muestras para el análisis y el material así como la instrumentación y software empleados.

Contenidos del capítulo:

- 4.1. Reactivos y productos*
- 4.2. Métodos de preparativa de muestras*
- 4.3. Métodos de análisis*
- 4.4. Software*

4.1. Reactivos y productos

El agua ultrapura utilizada para preparar todas las disoluciones acuosas se obtuvo a partir de un sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA). Los disolventes de metil tert-butil éter (MTBE) y los disolventes de alta calidad para la cromatografía líquida, tales como, acetonitrilo, isopropanol, formiato de amonio y metanol fueron proporcionados por Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania). Por otro lado, el disolvente diclorometano (DCM) fue suministrado por Scharlau (Barcelona, España).

El ácido tridecanoico (FA(13:0)); el 1,2,3-triheptadecanoilglicerol (TG(17:0,17:0,17:0)); la 1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PC(12:0/12:0)); la 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE(16:0/16:0)) y la n-hexanoil-d-esfingomielina (SM(d18:1/c6:0)) fueron utilizados como patrones lipídicos con una pureza superior al 95 %, siendo adquiridos en Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

4.1.1. Preparación de las disoluciones lipídicas

Las disoluciones madre fueron preparadas disolviendo los patrones lipídicos en DCM y MTBE a una concentración de 2 mg/mL y almacenadas a -20°C. Las disoluciones de trabajo fueron diluidas a 10 µg/mL en DCM o MTBE para emplearlas en los posteriores estudios.

4.2. Métodos de preparativa de muestras

4.2.1. Almacenamiento y manipulación de las muestras de plasma

Las muestras de plasma fueron suministradas por el Banco de Sangre de La Rioja, estas muestras procedieron de donantes anónimos. Para obtener las muestras de sangre, los sujetos acudieron a la sala de extracción sin ninguna condición acerca del ayuno. Una vez allí, la extracción se efectuó por venipuntura antecubital, colocando al sujeto en posición sentado.

La sangre extraída se procesó para obtener plasma mediante la centrifugación de la misma a 2200 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras de plasma fueron enviadas a los laboratorios para mantenerlas congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

4.2.2. Extracción de lípidos de las muestras de plasma

4.2.2.1. Extracción de lípidos con MTBE asistida con ultrasonidos

Para la extracción de los lípidos se requirieron alícuotas de 30 µL de plasma sanguíneo humano a los cuales se añaden 15 µL de agua Milli-Q. A continuación, se adicionaron 60 µL de metanol con la finalidad de precipitar las proteínas, este proceso fue asistido con agitación por Vortex durante 2 minutos

para favorecer la mezcla. Posteriormente, para realizar el proceso USAE se adicionaron diferentes cantidades de MTBE, esta variación en la cantidad de disolvente extractor se realizó porque este parámetro es uno de los factores que se incluyeron en la optimización del método de extracción propuesto en este trabajo. En el disolvente MTBE se introdujeron 10 µg/mL de los diferentes lípidos utilizados como patrones internos.

El proceso de extracción de lípidos se llevó a cabo sumergiendo la muestra en un equipo de baño de agua ultrasónica suministrado por ATU Ultrasonidos (Valencia, España). En este equipo se ajustaron tanto la frecuencia ultrasónica a 40 kHz como la potencia a 100 W, además se controlaron las condiciones de temperatura y tiempo para cada uno de los análisis. Una vez finalizada la extracción ultrasónica, se añadieron 75 µL de agua Milli-Q y la fase orgánica se separó por medio de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 10°C en una Rotina 38 (Hettich, Tuttlingen, Germany). Tras este proceso, el extracto lipídico, contenido en la fase orgánica, se localizaba en la parte superior, permitiendo ser extraído fácilmente y vertido a un vial de auto muestreo para su análisis.

La extracción de lípidos que se empleó tanto para abordar el proceso de descongelación como para la discriminación de los pacientes analizados mediante cromatografía líquida se llevó a cabo con las condiciones optimizadas obtenidas en la extracción de lípidos con MTBE-USAЕ siendo 25 la relación entre ($V_{\text{extractor}} (\mu\text{L})/V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})$) y establecida la temperatura del baño de agua ultrasónica a 15°C y el tiempo de ejecución a 30 min de duración.

4.2.2.2. Extracción de lípidos con DCM asistida con Vortex (Método de Bligh-Dyer)

Las especies lipídicas fueron extraídas [1] por el método descrito por Bligh y Dyer, con la sustitución del disolvente cloroformo por DCM [2]. Para realizar esta extracción se añadieron 200 µL de metanol a 30 µL de plasma sanguíneo humano. Una vez realizada la agitación por Vortex durante 20 segundos para homogeneizar la mezcla, se añadieron 400 µL de DCM, los cuales contenían los patrones internos en una concentración de 10 µg/mL y la mezcla fue sometida nuevamente a 20 segundos de Vortex. A continuación, fueron añadidos 120 µL de agua para inducir la separación de las fases, exponiendo la mezcla a la agitación de Vortex durante 10 segundos. Después de estabilizar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente, el extracto se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos a 10°C. En este caso, el extracto lipídico se localizaba en la fase inferior de la mezcla, siendo recogido y vertido en un vial de auto muestreo para su posterior análisis.

4.2.2.3. Extracción de lípidos con MTBE asistida con Vortex

La extracción de lípidos empleando MTBE fue realizada de acuerdo a los protocolos descritos previamente [3, 4]. Un total de 20 μL de plasma fue mezclados con 10 μL de agua Milli-Q. Posteriormente, las proteínas fueron precipitadas por la adición de 40 μL de metanol con ayuda de una agitación de Vortex mediante 2 minutos. A continuación, fueron adicionados 200 μL de MTBE que contenían una concentración de patrones internos de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agitada toda la mezcla durante 1 hora con Vortex. Después de la adición de 50 μL de agua Milli-Q, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 10°C. El extracto lipídico con este método se localizaba en la fase superior, por encontrarse en ésta el MTBE. Una vez recogidos los extractos eran vertidos en viales de auto muestreo.

4.3. Métodos de análisis

4.3.1. Análisis de muestras mediante FT-IR

Para la obtención de los perfiles metabólicos de cada una de las muestras de plasma que han sido objeto de estudio se ha empleado el espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier MB3000 de ABB (Zurich, Switzerland).

Los componentes instrumentales del espectrofotómetro FT-IR MB3000 de ABB son los siguientes (Figura 4.3.1):

1. Interferómetro de Michelson.
2. Divisor de haz de ZnSe.
3. Fuente de radiación: láser de estado sólido.
4. Detector piroeléctrico de sulfato de triglina deuterada.

La cubeta desmontable para muestras líquidas de PerkinElmer (Cell Ommi, Specac Ltd., Reino Unido) utilizada para la obtención de los espectros consta de dos ventanas de CaF_2 que se encuentran separadas por un espaciador de Mylar de 50 micras, permitiendo fijar el camino óptico.

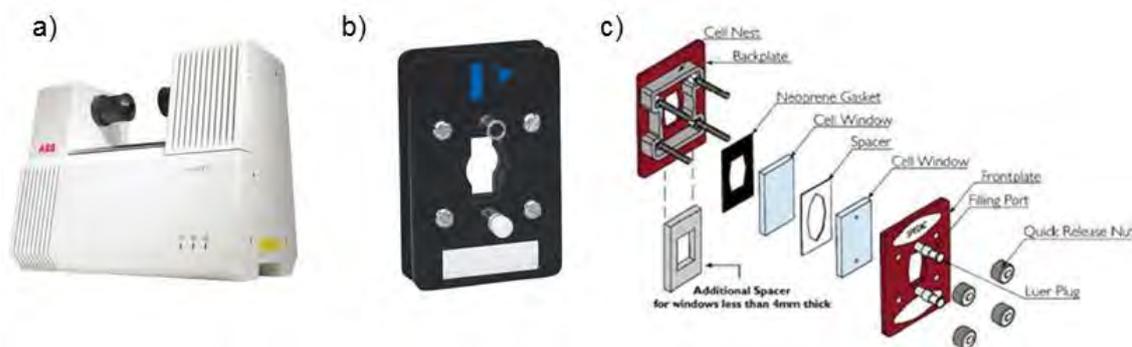


Figura 4.3.1. Imagen del equipo e instrumentación empleada: a) Espectrofotómetro FT-IR MB3000. b) Cubeta para líquidos de PerkinElmer. c) Componentes de la cubeta de líquidos de PerkinElmer.

El procedimiento que se ha llevado a cabo para la obtención de los perfiles metabólicos es el siguiente:

1. Abrir la fuente de N₂. Debe permanecer abierta mientras se realizan las medidas espectroscópicas para purgar el equipo eliminando así el vapor de agua atmosférico y CO₂.
2. Encender el programa Horizon MBTM y fijar los parámetros de adquisición del método (Tabla 4.3.1). Las condiciones de las siguientes medidas fueron realizadas a una temperatura de 23,0 ± 1,0°C.
3. Realizar una referencia colocando la cubeta con una muestra de agua Milli-Q. La referencia debe realizarse antes de la medida de cada una de las muestras con el objetivo de comprobar que las condiciones de medida son estables y los datos obtenidos no se encuentran perturbados por la temperatura u otros factores.
4. Desmontar la cubeta de PerkinElmer y añadir 25 µL de la muestra de plasma entre las ventanas de CaF₂. Cada una de las muestras debe medirse por triplicado para minimizar posibles errores experimentales.
5. Obtención del espectro IR entre 4000-300 cm⁻¹.

Para realizar un nuevo espectro es necesario desmontar la cubeta de PerkinElmer y limpiar con agua destilada tanto las ventanas de CaF₂ como el espaciador de Mylar. Deben secarse utilizando papel de seda. Durante el análisis fue necesario utilizar muestras control (QC) para comprobar el rendimiento de la metodología y probar su reproducibilidad. Las muestras controles fueron procesadas de la misma manera que las muestras reales y se insertaron regularmente durante los análisis [5].

Tabla 4.3.1. Parámetros de adquisición del método.

Resolución	2 cm ⁻¹
Scans	32
Modo de adquisición	Absorbancia
Número de onda inicial	300 cm ⁻¹
Número de onda final	400 cm ⁻¹
Ganancia del detector	27.13

4.3.2. Análisis de muestras mediante UPLC-MS

Para obtener el perfil lipídico de plasma sanguíneo es necesario realizar una separación cromatográfica. Para ello se utilizó un sistema de Ultra resolución LC ACQUITY (Waters, Milford, MA, EEUU) (Figura 4.3.2) con un inyector automático (Waters, Milford, MA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución microTOF II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) equipado con una fuente ESI (ionización por electrospray). La columna analítica que se empleó para llevar a cabo la determinación de estos compuestos es una columna Waters Acquity HSS T3 100 x 2,1 (i.d.) mm con un tamaño de 1,8 μm y una precolumna Waters VanGuard del mismo material. Las condiciones de trabajo fijadas para el sistema UPLC-ESI-MS en modo de exploración completa, para obtener la separación de los espectros, fueron en modo de ionización positivo entre m/z 50 - 1500 y en ionización negativa entre m/z 120 - 3000, empleando un potencial capilar de 4.5 y 3.5 kV para ambas polaridades, respectivamente. El espectrómetro de masas se calibró a través del rango de masa utilizando referencias internas. Para ayudar en la generación de los iones se empleó un flujo de gas N₂ de 9,0 L/min a unas condiciones de 200°C y 3,0 bar de presión, introducido de manera coaxial (como gas nebulizador) alrededor del emisor de la fuente ESI.



Figura 4.3.2. UPLC-MS Waters acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución microTOF II Bruker Daltonics.

Los extractos de lípidos se diluyeron 5 veces con disolvente de inyección antes de la realización del análisis. Una vez realizado este último paso, se depositaron las muestras en el carro del equipo, donde la temperatura fue fijada y mantenida a 5°C, mientras que la temperatura de la columna fue establecida en 55°C.

En cuanto a las fases empleadas en el análisis, la fase móvil para la elución de estos compuestos fue una mezcla de acetonitrilo-agua (60:40, v/v) con formiato de amonio 10 mM (disolvente A) y una mezcla de acetonitrilo-isopropanol (10:90, v/v) con formiato de amonio 10 mM (disolvente B). La elución varió de acuerdo con un gradiente lineal que aumentó de un 40% a un 100% de B en 10 minutos, y se mantuvo a 100% de B durante 2 minutos adicionales. A continuación, se aumentó de 0% a 60% la fase A en 3 min, finalizando el gradiente lineal con las condiciones iniciales (60% fase A/40% fase B) y manteniendo estas proporciones durante 0.5 minutos. Por lo tanto, el tiempo total de ejecución fue de 15.50 minutos. El caudal se fijó en 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 µL.

Los datos cromatográficos y de espectrometría de masas se adquirieron con ayuda del software Data Analysis Version 4.0 de Bruker Daltonik (GMBH, Alemania).

En el estudio realizado para discriminar los pacientes mediante cromatografía líquida se pudieron realizar tanto análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) como de monitorización de múltiples reacciones (MRM), gracias a la posibilidad que ofrece la cromatografía de permitir el acoplamiento de una fuente de ionización electrospray. Estas técnicas de espectrometría se utilizaron para detectar y seleccionar un segundo filtro de cada ión con el objetivo de obtener una fragmentación y realizar una identificación más exhaustiva.

4.3.2.1. Análisis de datos e identificación de picos

Los archivos brutos obtenidos con el equipo LC-MS han de someterse a una conversión de formatos para pasar del formato Bruker original al formato netCDF (*.cdf) con el objetivo de asegurar la compatibilidad de formatos con los posteriores paquetes de bioinformática empleados. A continuación, se utilizó el paquete XCMS disponible en el lenguaje de programación R para conseguir la alineación del tiempo de retención no lineal, el filtrado y la detección de los picos [6].

Los datos previamente fueron deconvolucionados utilizando el comando `xcmsSet`, estableciendo los siguientes parámetros:

- Para el filtrado, se utilizó el método `matched filter`, y se establecieron los valores de `fwhm` en 10 y de `snthresh` en 10.

- Para la alineación se empleó con el comando `group`, fijando los parámetros de `bw` a un valor de 2, de `minfrac` a 0,5 y, por último, de `mzwid` a 0,7.

Los tiempos de retención fueron corregidos empleando el comando `retcor` y estableciendo como forma de los picos la forma gaussiana. Por último, los datos fueron alineados de nuevo aplicando o el comando `group`, fijando los mismos valores a sus parámetros. Como algunos datos aparecían sin valor, se rellenaron los mismos ejecutando el comando `fillpeaks`. Como resultado final, se obtuvo una matriz con las señales metabólicas (formada por las m/z exactas y los correspondientes tiempos de retención) y las áreas de picos que definieron a cada una de las muestras. A continuación, se aplicó el paquete R CAMERA para agrupar las diferentes masas pertenecientes al mismo metabolito, ya que pueden ser isótopos o metabolitos ionizados formando diferentes aductos [7]. La correlación requerida tanto a través de picos como a través de muestras se estableció en 0,75.

Una vez obtenida esta matriz, se llevó a cabo la eliminación del ruido de fondo utilizando el software `enviMass` [8]. Para ello, se restaron las masas correspondientes a las muestras de blanco, que contenían las masas asignadas exclusivamente a los disolventes, a las matrices de las muestras.

Para el estudio de la extracción de lípidos utilizando MTBE-USAE, los picos o señales metabólicas fueron comparados entre los diferentes protocolos estudiados con el fin de identificar las diferencias existentes entre las metodologías extractivas. Para conseguir esta comparación se establecieron los siguientes parámetros como diferencias lipídicas: aquellos pares de picos que poseían una diferencia de $m/z < 0.01$ y una diferencia de tiempo de retención de $t_r < 6$ segundos fueron considerados como picos determinantes del protocolo de extracción analizado.

Para el estudio de descongelación, los picos característicos de cada protocolo de descongelación se establecieron de la misma manera que para el estudio de la extracción de lípidos. Los resultados obtenidos de cada diferencia para cada procedimiento de descongelación y modo de ionización fueron representados mediante diagramas de Venn, gráfico que va a facilitar la visualización de los resultados.

Por último, se identificaron los distintos lípidos mediante la búsqueda de las masas y los tiempos de retención en diferentes bases de datos con disponibilidad on-line, como son: HMDB (<http://hmdb.ca>), LIPIDMAPS (<http://lipidMAPS.org>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) y KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

4.4. Software utilizado

En este apartado se recogen los programas informáticos empleados en realizar los trabajos de investigación abordados en esta tesis.

- The Unscrambler v8.0, CAMO ASA, Oslo, Noruega.
- MATLAB, High-performance numeric computation and visualization software, Version 6.5 for Windows, The MathWorks, Massachusetts, Estados Unidos.
- V-PARVUS 2004: An Extendable Package of Programs for Data Explorative Analysis, Classification and Regression Analysis. Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari, Genova, Italia.
- Nemrod-W version 2001, LPRAI, Marsella, Francia.
- DataAnalysis Version 4.0 de Bruker Daltonics, Colonia Alemania.
- The R Project for Statistical Computing, con los paquetes CAMERA y XCMS. Software Open Access.
- EnviMass version 1.2 target screening software. Software Open Access.

Referencias

- [1] Hu, C., van Dommelen, J., van der Heijden, R., Spijksma, G., Reijmers, T.H., Wang, M., et al. RPLC-Ion-Trap-FTMS method for lipid profiling of plasma: Method validation and application to p53 mutant mouse model. *Journal of Proteome Research*. (2008), 7, 4982-4991.
- [2] Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (1959), 37, 911-917.
- [3] Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T.V., Shevchenko, A., Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*. (2008), 49, 1137-1146.
- [4] Whiley, L., Godzien, J., Ruperez, F.J., Legido-Quigley, C., Barbas, C. In-Vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Analytical Chemistry*. (2012), 84, 5992-5999.
- [5] Sangster, T., Major, H., Plumb, R., Wilson, A.J., Wilson, I.D. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *Analyst*. (2006), 131, 1075-1078.
- [6] Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*. (2006), 78, 779-787.
- [7] Kuhl, C., Tautenhahn, R., Bottcher, C., Larson, T.R., Neumann, S. CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry*. (2012), 84, 283-289.
- [8] Loos, M., Ruff, M., Singer, H. *EnviMass version 1.2 target screening software*. Eawag Dübendorf, Switzerland (2011).

CAPÍTULO 5

Resultados y discusión



El presente capítulo recoge los trabajos de investigación que se han realizado a lo largo de la presente tesis, entre éstos se encuentra el desarrollo de un proceso optimizado de extracción de lípidos de muestras plasmáticas, así como la implantación de un protocolo novedoso de descongelación de muestras plasmáticas asistido por energía ultrasónica. Posteriormente se plasman dos trabajos centrados en la discriminación de pacientes con diferente evolución serológica de la enfermedad inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana y la co-infección con la enfermedad oportunista hepatitis C a través de dos plataformas analíticas.

Contenidos del capítulo:

- 5.1. *Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas*
 - 5.1.1. *Extracción asistida de lípidos de muestras biológicas*
 - 5.1.2. *Conservación de muestras biológicas en laboratorios clínicos: congelación-descongelación*
- 5.2. *Análisis del perfil metabólico y lipidómico de pacientes con VIH y co-infectados con VHC mediante espectroscopia óptica y cromatografía líquida*
 - 5.2.1. *Discriminación de pacientes con diferentes evoluciones serológicas del VIH y de la co-infección con VHC utilizando huellas dactilares metabólicas obtenidas mediante FT-IR*
 - 5.2.2. *Análisis lipidómico para descubrir y caracterizar potenciales biomarcadores en pacientes con diferentes etapas de infección por VIH y co-infección por VHC mediante UPLC-ESI-QTOF/MS*

5.1. Etapas pre-analíticas y pretratamientos de muestras biológicas

Para poder obtener datos lipidómicos de alta calidad cobra suma importancia las etapas previas al análisis, consideradas preparativa de muestra, ya que estas etapas pueden tener grandes repercusiones en la exactitud de los análisis, viéndose comprometida la interpretación biológica de los datos [2]. Por esta razón, las etapas de congelación/descongelación y extracción de los lípidos son claves en el posterior análisis lipídico que se realiza para evaluar la diversidad química y biológica de estos compuestos existentes en las muestras. Este hecho justifica el gran interés que existe en la actualidad por el desarrollo de nuevos métodos de preparativa de muestras simples y robustos, centrado su aplicación en el análisis de lípidos de matrices biológicas tales como biofluidos (plasma, suero, etc.).

5.1.1. Extracción asistida de lípidos de muestras biológicas

5.1.1.1. Introducción

Los métodos más populares para la extracción de lípidos, método de Folch [3] y método de Bligh y Dyer [4], se basan en extracciones líquido-líquido. Concretamente, estos métodos presentan ciertas desventajas en términos de seguridad por la utilización de cloroformo como disolvente extractor, caracterizado por ser un disolvente altamente tóxico y carcinógeno. La metodología desarrollada por Folch se fundamenta en el uso de una mezcla de disolventes orgánicos en diferentes proporciones, cloroformo y metanol (2:1), mientras que el método de Bligh y Dyer incorpora agua, como un componente extractante, a la mezcla de estos disolventes orgánicos para permitir reducir las proporciones de los mismos.

Para eliminar el empleo del cloroformo de los métodos citados y su problemática, se propuso la utilización del disolvente diclorometano como una alternativa en la extracción de lípidos [5, 6]. Sin embargo, este método también es perjudicial para el medio ambiente, ya que emplea un disolvente clorado. Como solución a la toxicidad presentada por estos disolventes, se introdujo como alternativa la utilización del MTBE para la extracción de lípidos [1, 7], quedando demostrado que su empleo proporciona resultados comparables a los obtenidos con el método de Bligh y Dyer. Además, se debe destacar que este disolvente facilita la recolección del extracto gracias a la menor densidad que posee el MTBE comparándola con la del agua. A pesar de las ventajas que muestran los protocolos de extracción de lípidos en plasma sanguíneo empleando MTBE, estos procesos requieren largos tiempos de extracción [1, 7], condición contrapuesta a la viabilidad de los estudios de lípidos a gran escala, donde prima la eliminación/reducción del tiempo en las etapas de preparativa de muestra [8].

En determinadas etapas analíticas se aplica como tratamiento poderoso la energía ultrasónica, ya que facilita la aceleración de dichos procesos [9-11]. Esta capacidad ha hecho que en los últimos años la extracción asistida por ultrasonidos (USAE) haya sido ampliamente utilizada para facilitar la transferencia de masa entre fases inmiscibles [12]. USAE es una técnica de extracción eficiente que proporciona alta reproducibilidad, requiere tiempos más cortos, simplifica la manipulación y aumenta los rendimientos de calidad del extracto [13, 14].

Teniendo en cuenta la necesidad de desarrollar métodos cada vez más simples, sensibles y eficientes para la obtención del perfil lipídico, el objetivo del presente apartado fue la presentación de un nuevo método sensible basado en la extracción con MTBE y ultrasonidos combinado con LC-ESIqToF-MS para realizar un análisis exhaustivo de la huella lipídica de muestras de plasma sanguíneo humano. La optimización de las variables que afectan a la extracción MTBE-USAE se abordó a través de la aplicación de las herramientas del diseño de experimentos. Los parámetros investigados para definir las condiciones de este método de extracción se centraron en: determinar las múltiples clases de lípidos, reducir el tiempo de extracción, aumentar la proporción de picos detectados y de lípidos identificados, así como conseguir un menor sesgo y una alta eficiencia en la extracción. Posteriormente, se realizó una comparación del nuevo procedimiento de extracción de lípidos asistido por MTBE-USAE con los métodos previamente propuestos en la bibliografía para analizar si este método propuesto podría llegar a ser un método de referencia para la realización del perfilado lipídico [1, 6, 7].

5.1.1.2. Desarrollo experimental

En lo referente a reactivos, preparación de las soluciones lipídicas, almacenamiento y manipulación de las muestras de plasma, preparativa de las muestras y extracción de lípidos por los distintos métodos se remite al Capítulo 4 (Desarrollo experimental). También en ese capítulo se ha incluido las condiciones experimentales utilizadas en la cromatografía líquida, el análisis de los datos y la identificación de lípidos.

5.1.1.3. Optimización de las condiciones de extracción lipídica aplicando Ultrasonidos

Este estudio se centró en el desarrollo de una nueva metodología analítica basada en el uso de MTBE y energía ultrasónica en combinación con LC-ESIqToF-MS para determinar el amplio perfil lipídico de muestras de plasma sanguíneo. Antes de implementar un método de extracción como método final, se debe de comprobar que dicha extracción se ejecuta de forma completa y relevante para asegurar la validación de los datos obtenidos [15]. Para realizar la optimización de un proceso de extracción, se tiene que llevar a cabo un

estudio que tenga en cuenta todos los parámetros que afectan significativamente en la eficiencia de dicho proceso. En este contexto, como se ha mencionado, para la optimización del proceso de extracción de lípidos asistido por energía ultrasónica a partir de plasma humano se requirió la realización de un estudio centrado en los distintos factores que son determinantes en dicha extracción, quedando resumidos éstos en:

- tipo de disolvente extractor y volumen empleado
- temperatura
- tiempo de extracción

Una vez fijado y seleccionado el disolvente de extracción, MTBE, se aplicó la metodología de diseño de experimentos para evaluar simultáneamente el efecto de los factores influyentes sobre el rendimiento de esta etapa de preparación de muestra. Una vez optimizada la extracción de lípidos con MTBE-USAE, con el fin de evaluar este método de extracción propuesto con respecto a sus predecesores, se realizó un estudio comparativo de diferentes perfiles lipídicos obtenidos con este método innovador y los previamente citados [1, 6, 7]. De esta manera, se pudo detectar la existencia de diferencias significativas entre los métodos evaluados en términos de tiempo de extracción, repetibilidad analítica, eficiencia de extracción y detección de picos.

Entre los diferentes factores que afectan a la extracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos está la elección del disolvente, siendo éste uno de los parámetros clave en este tipo de procedimientos. Teniendo en cuenta las características físico-químicas que presentan tanto la matriz biológica como los metabolitos que se quieren extraer fue seleccionado como disolvente el MTBE, ya que este solvente presenta unos beneficios notables por su baja densidad, polaridad y toxicidad [1, 7]. Posteriormente, se investigaron las condiciones óptimas del resto de parámetros que afectan significativamente en el rendimiento de la extracción lipídica (temperatura, tiempo de extracción y relación de volúmenes $V_{\text{extractor}} (\mu\text{L})/V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})$), empleando para ello la metodología basada en el diseño de experimentos. Para determinar el dominio experimental de cada uno de los factores se realizaron experimentos preliminares teniendo en cuenta los límites operativos de los equipos. Estas consideraciones permitieron establecer los siguientes rangos de estudio: para el tiempo de extracción ultrasónica (5 a 60 minutos), para la temperatura (5 a 25°C) y para la relación de disolvente de extracción con respecto al volumen de la muestra ($V_{\text{extractor}} (\mu\text{L})/V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})$) (5 a 25). Este último rango fue limitado al establecer inicialmente un volumen fijo de 30 μL de plasma sanguíneo, de forma que la cantidad de MTBE que se requería en cada caso varió entre 150 a 750 μL .

Para evaluar estos factores en los rangos anteriormente definidos, se aplicó el método de CCD [16] a partir de los datos obtenidos de 21 experimentos, siendo estos experimentos realizados por triplicado y de forma aleatoria. Tres de estos experimentos se repitieron con las condiciones establecidas de los factores en el punto central para estimar la repetibilidad experimental. También se incluyeron cuatro puntos fijados en los vértices de un tetraedro regular dentro de una esfera con radio de 0.5. Este modelo se empleó para obtener la superficie de respuesta mediante el ajuste los datos a un modelo polinomial, teniendo en cuenta la evaluación de los efectos de cada uno de los factores y también los efectos de las interacciones entre factores.

Para analizar las superficies de respuestas se eligieron tres lípidos de cada una de las familias de estos metabolitos (fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), triglicéridos (TG), ácidos grasos (FA), éster colesterol (ChoE), lisofosfatidilcolinas (LPC) y fosfatidilserinas (PS)). Como se observaron patrones de comportamiento similares dentro de cada familia de lípidos, se seleccionaron siete superficies de respuesta, una superficie por familia lipídica (Tabla 5.1.1).

Las condiciones experimentales estudiadas del CCD y los resultados de integración de las áreas de los lípidos seleccionados son recogidos en la Tabla 5.1.2.

La función del modelo fue descrita por la ecuación 1:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

donde X_i correspondían a los factores estudiados (tiempo de exposición, temperatura y relación entre el $V_{extractor}/V_{muestra}$) y la variable Y representaba el área de los picos de cada lípido seleccionado perteneciente a las diferentes familias.

Las estimaciones de los coeficientes para los modelos de cada respuesta se calcularon mediante la regresión lineal por mínimos cuadrados y estos modelos fueron analizados y validados por ANOVA y los puntos test empleando el software Nemrod-W. Para todas las familias lipídicas estudiadas, los modelos matemáticos creados fueron aceptados, ya que estos modelos eran significativos y explicaban correctamente el comportamiento de los lípidos en el dominio experimental seleccionado, de manera que permitían realizar con fiabilidad su posterior análisis.

Tabla 5.1.1. Lípidos seleccionados como repuestas del diseño de experimentos.

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Ácidos grasos	FA	282.2549	2.8369	282.2564	-5.4018	FA(18:1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻
Glicerolípidos	TG	856.7433	8.9527	856.7514	-9.5424	TG(52:3)	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Esteroles	CE	672.5845	9.2544	672.5839	0.8909	CE(20:4)	C ₄₇ H ₇₆ O ₂	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	SM	700.5519	4.2841	700.5514	0.7204	SM(d16:1/18:1)	C ₃₉ H ₇₇ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺
Glicerofosfolípidos	LPC	523.3664	1.9506	523.3633	5.9729	LPC(18:0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	PC	781.5612	4.9574	781.5617	-0.5923	PC(36:4)	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PS	803.5619	5.0317	803.5681	-7.7514	PS(37:1)	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.2. Matriz del diseño de experimentos y las recuperaciones medias para los compuestos estudiados (n=3).

Nº. Exp	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Vs/Vt	Intensidad de picos (cuentas de área)						
				PC	SM	TG	FA	ChoE	LPC	PS
1	17	9	9	56322	16326	147989	35423	20503	8846	35284
2	49	9	9	73009	18985	148974	43418	21342	7933	38666
3	17	21	9	73992	24883	154244	34537	23170	11886	43469
4	49	21	9	68396	19844	129627	45195	21357	9103	46680
5	17	9	21	87039	19931	248367	55427	32709	13273	47658
6	49	9	21	93075	21897	262697	54488	26738	9655	48697
7	17	21	21	91280	23239	266319	61526	38380	13366	50181

Tabla 5.1.2. (Continúa)

Nº. Exp	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Vs/Vt	Intensidad de picos (cuentas de área)						
				PC	SM	TG	FA	ChoE	LPC	PS
8	49	21	21	75473	19572	282432	63946	27054	9462	49387
9	5	15	15	71272	17498	203746	48791	24608	11109	36854
10	60	15	15	71035	16340	197322	55954	18042	7450	38547
11	33	5	15	85878	13197	222810	62236	22891	9368	49509
12	33	25	15	81252	17413	220725	68507	26673	10183	55168
13	33	15	5	61084	27959	88803	15667	24827	11155	38060
14	33	15	25	92039	30200	279518	48552	39029	13367	51096
Central	33	15	15	77452	21484	201856	57647	27613	10733	41749
Central	33	15	15	75726	20672	218373	57598	27428	11064	41473
Central	33	15	15	77453	21361	211160	54882	27764	10664	41643
Test1	22	13	13	69787	18988	191525	51128	25172	10951	37513
Test2	44	13	13	73327	19924	181741	51201	23869	9615	39629
Test3	33	20	13	75079	20294	163662	55444	26244	10721	44097
Test4	33	15	20	85383	23656	255945	59972	32977	11787	45581

Los coeficientes del modelo para cada respuesta se muestran en la siguiente Tabla:

Tabla 5.1.3. Estimaciones de los coeficientes de los modelos para las respuestas

Coeficiente	PC	SM	TG	FA	ChoE	LPC	PS
b ₀	76484.35	2093.36	206030.58	567.35	27525.98	10842.30	4125.53
b ₁	54.67	-40.32	-644.58	21.78	-2131.70	-1266.97	73.82
b ₂	-571.51	125.23	88.49	19.88	1109.03	389.76	209.54
b ₃	9468.21	64.80	59652.76	98.14	4626.91	849.08	400.37
b ₁₁	-1890.36	-138.11	-1096.02	-15.97	-2099.81	-536.42	-129.56
b ₂₂	2554.86	-201.85	5461.67	30.48	-900.30	-382.71	392.09
b ₃₃	94.19	297.15	-6958.57	-88.61	1695.43	510.50	116.80
b ₁₂	-5508.63	-168.76	-2777.52	8.52	-1007.51	-271.23	-26.77
b ₁₃	-2600.47	6.36	6959.28	-20.47	-2046.83	-479.86	-81.08
b ₂₃	-3313.33	-103.55	7177.34	18.31	410.61	-530.93	-160.50

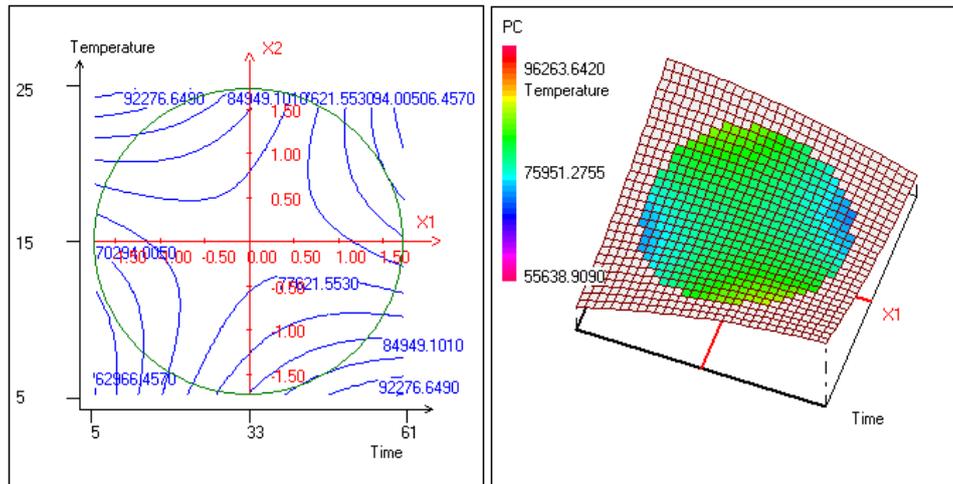
Al analizar la Tabla 5.1.3 se detecta que los factores no deben de ser estudiados por separado, ya que existen interacciones significativas entre ellos. Por otro lado, tras el estudio de las superficies de respuesta de los diferentes lípidos evaluados se observó que están influenciados de diferente manera con respecto a los factores estudiados, presentando diferentes patrones de comportamiento. De esta forma, se pudo concluir que las condiciones óptimas para la extracción de cada una de las familias lipídicas eran diferentes.

5.1.1.4. Evaluación del comportamiento en la extracción de las distintas familias de lípidos

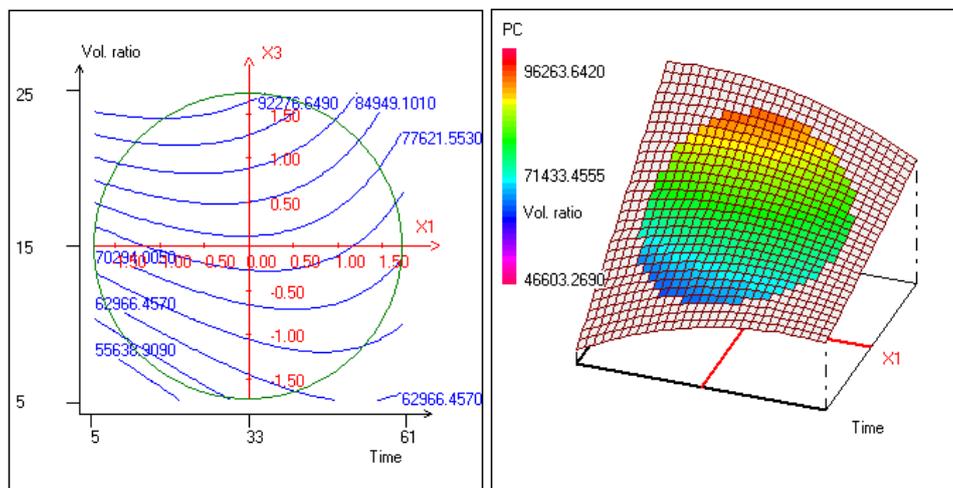
Análisis de las diferentes superficies de respuesta asociadas a cada familia lipídica

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de PCs (Figura 5.1.1) tuvieron el mismo comportamiento frente a temperaturas y tiempos de extracción tanto bajos como altos, ya que en ambos casos estas condiciones se tradujeron en una disminución de la eficiencia de extracción. Sin embargo, independientemente del tiempo empleado y de la temperatura fijada, la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonidos aumentó cuando las relaciones de volumen extractor fueron mayores.

(a)



(b)



(c)

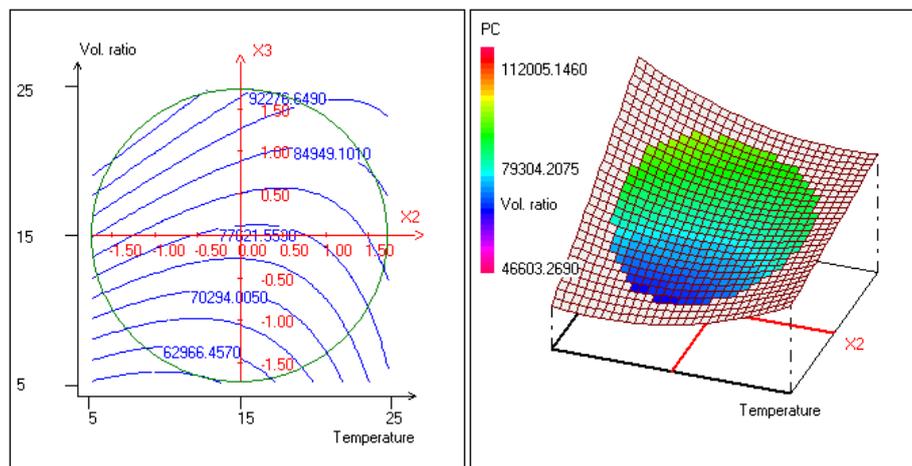
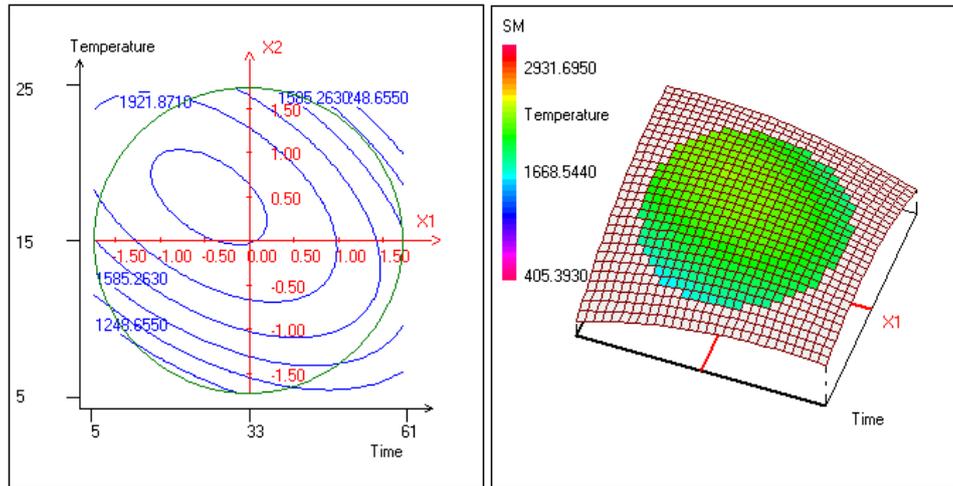


Figura 5.1.1. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para las PCs: (a) tiempo de extracción frente a temperatura, fijando la relación $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$ en 15; (b) tiempo de extracción frente a la relación $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando la temperatura en 15°C ; y (c) temperatura frente a la relación $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando el tiempo de extracción en 33 minutos.

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de las SMS (Figura 5.1.2) tuvieron el mismo comportamiento, presentando un aumento de la eficiencia de extracción cuando se aumentaba la temperatura o se incrementaba el tiempo de extracción, con la condición de que fuesen empleados en el proceso tanto niveles bajos como altos de las relaciones de volumen. La condición óptima para la extracción de esta familia se localizó a una temperatura de 18°C y un tiempo de extracción de 25 minutos.

(a)



(b)

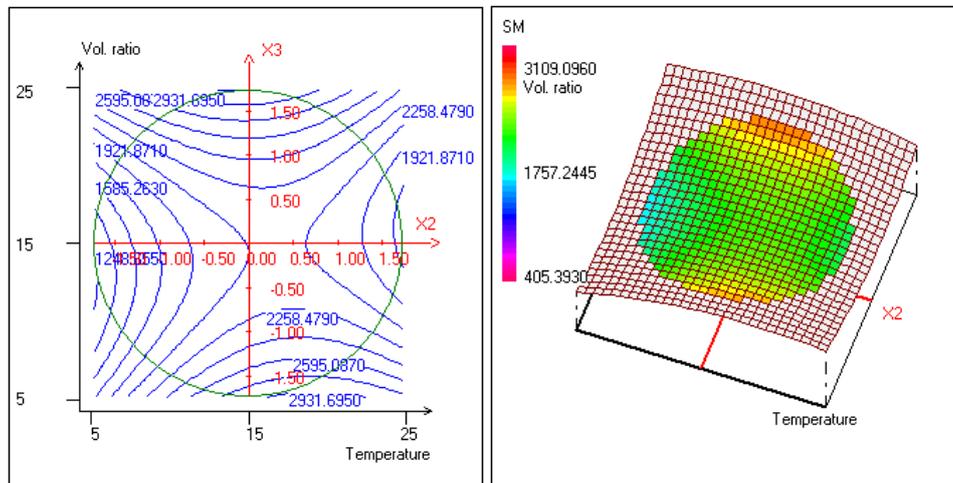
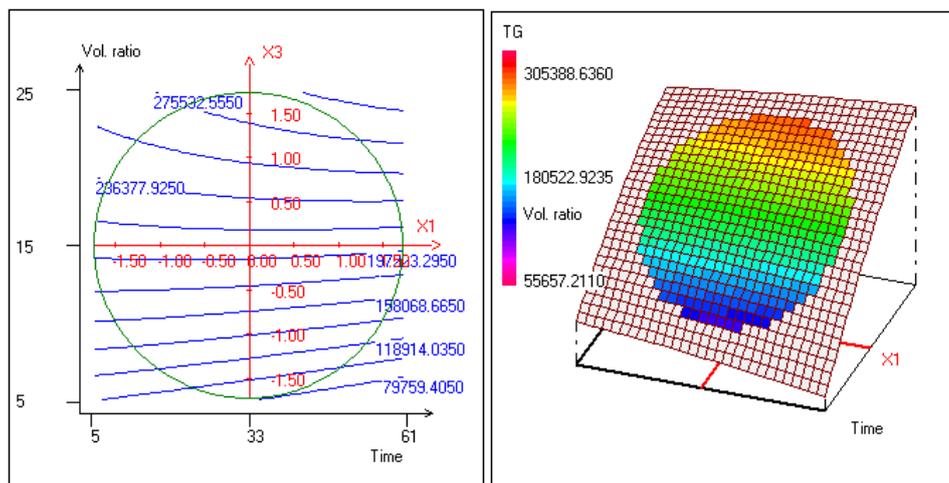


Figura 5.1.2. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para las SMS: (a) tiempo de extracción frente a temperatura, fijando la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$ en 15; y (b) temperatura frente a la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando el tiempo de extracción en 33 minutos.

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de los TGs (Figura 5.1.3) presentaron una notable independencia con respecto a las variaciones de los factores tiempo y temperatura, definiendo como factor determinante para esta familia la relación de volumen entre disolvente extractor y cantidad de muestra plasmática, siendo correlacionado un aumento del volumen de MTBE con un aumento en la señal de estos lípidos.

(a)



(b)

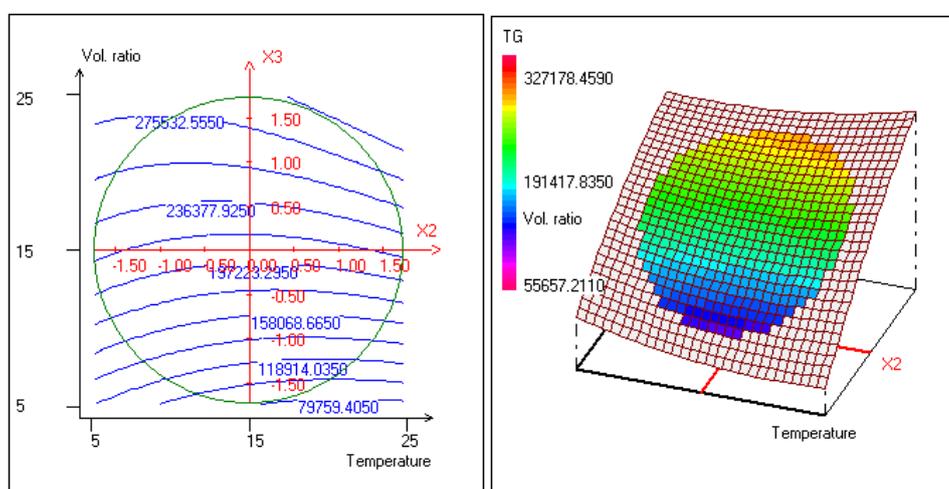


Figura 5.1.3. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para los TGs: (a) tiempo de extracción frente a la relación de $V_{extractor}/V_{muestra}$, fijando la temperatura a 15°C ; y (b) temperatura frente a la relación de $V_{extractor}/V_{muestra}$, fijando el tiempo de extracción en 33 minutos.

La superficie de respuesta correspondiente a la familia de FAs (Figura 5.1.4) mostró un comportamiento particular para unas determinadas condiciones, obteniéndose los mayores valores de extracción de estos compuestos cuando la temperatura fijada en el proceso se aproximaba a la temperatura ambiente y se empleaba una relación de volúmenes en un rango de 15-25.

(a)

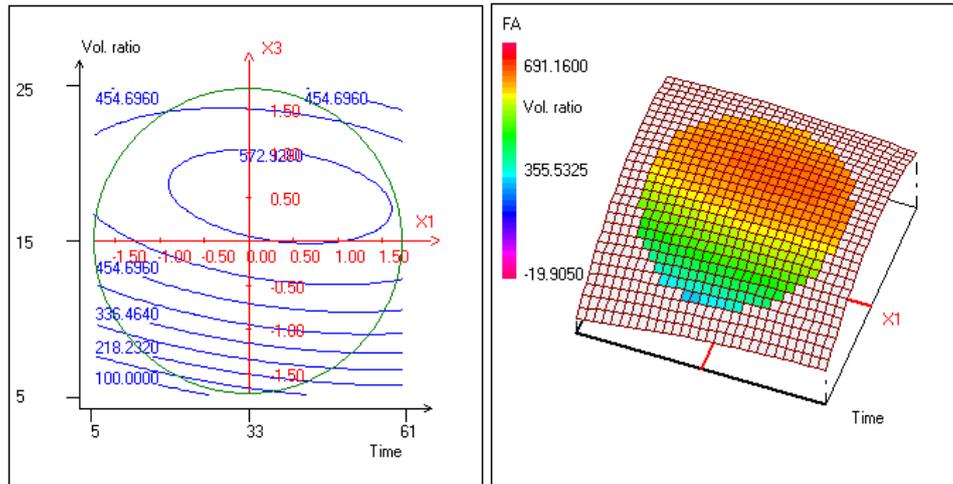
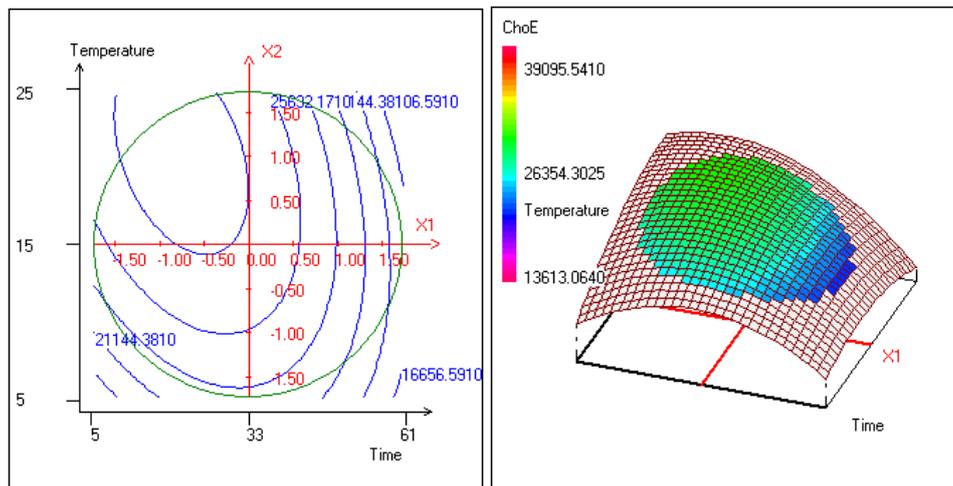


Figura 5.1.4. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para los FAs: (a) tiempo de extracción frente a la relación de $V_{extractor}/V_{muestra}$, fijando la temperatura a 15°C .

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de los ChoEs (Figura 5.1.5) mostraron valores altos de eficiencia cuando se combinaban tiempos cortos de extracción con temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. Con estas condiciones se consiguieron los valores más altos de extracción cuando, a su vez, se emplearon relaciones de volumen elevadas. Sin embargo, este valor de eficiencia disminuía conforme el tiempo de extracción se incrementaba.

(a)



(b)

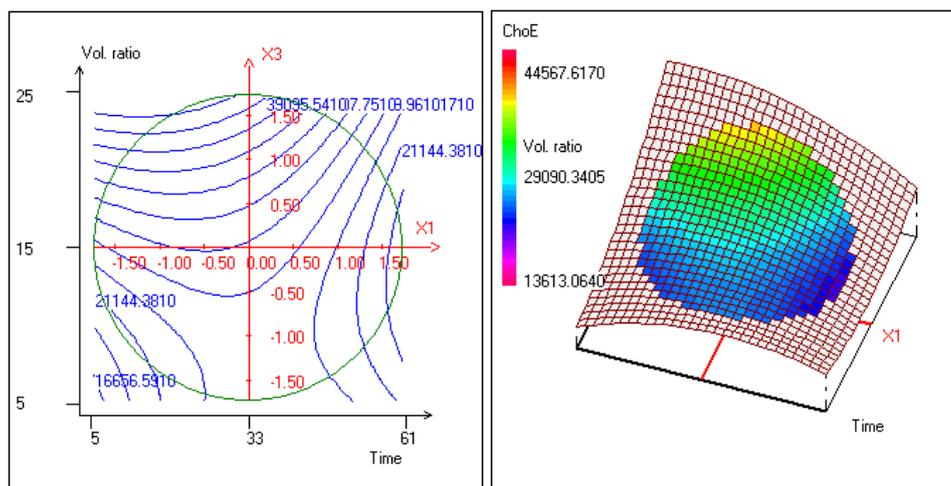
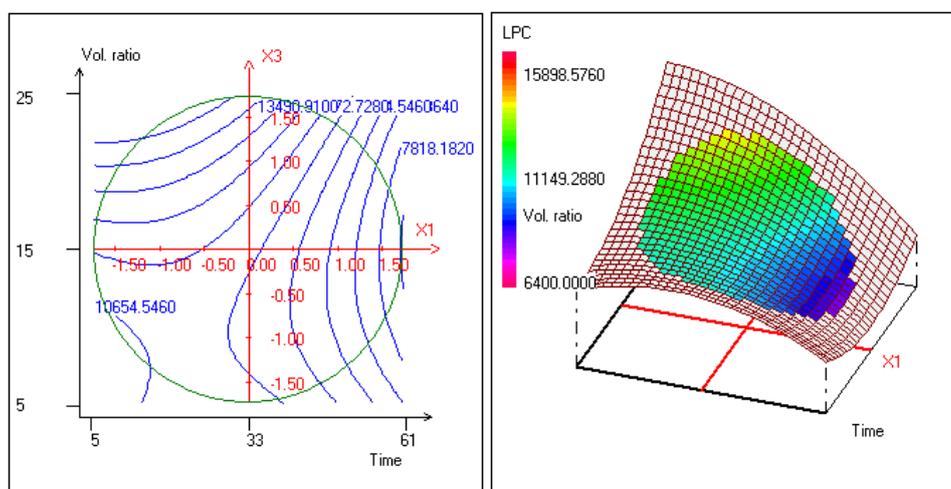


Figura 5.1.5. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para los ChoEs: (a) tiempo de extracción frente a temperatura, fijando la relación de Vextractor/Vmuestra en 15; y (b) tiempo de extracción frente a la relación de Vextractor/Vmuestra, fijando la temperatura a 15°C.

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de las LPCs (Figura 5.1.6) mostraron las condiciones óptimas para la extracción de estos compuestos cuando se fijaban los tiempos de extracción en los valores más bajos. Analizando las relaciones que presentaban los factores temperatura-relación de volumen se pudo destacar que si se empleaban volúmenes pequeños de MTBE era necesario incrementar la temperatura a condiciones ambientales para mejorar la señal de este tipo de compuestos. Sin embargo, si se aumentaba la cantidad de volumen se producía un aumento de la respuesta, independientemente de la temperatura fijada para la realización de estas extracciones.

(a)



(b)

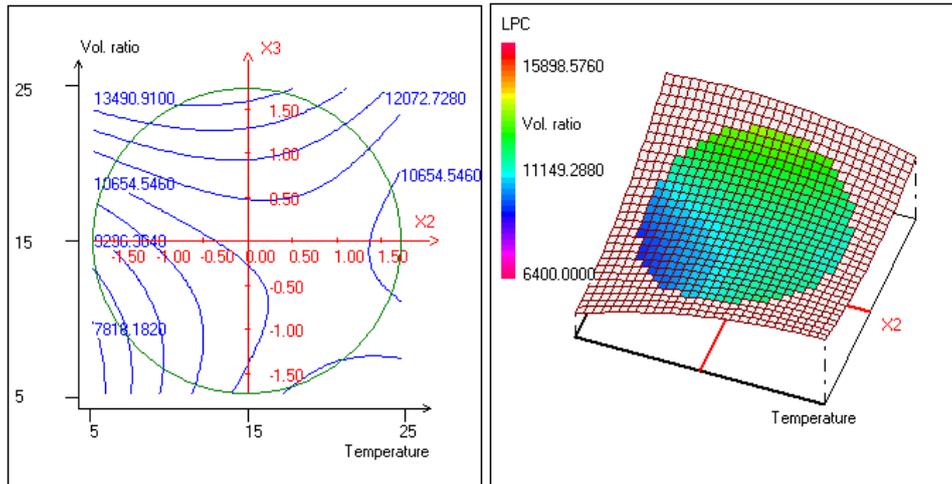
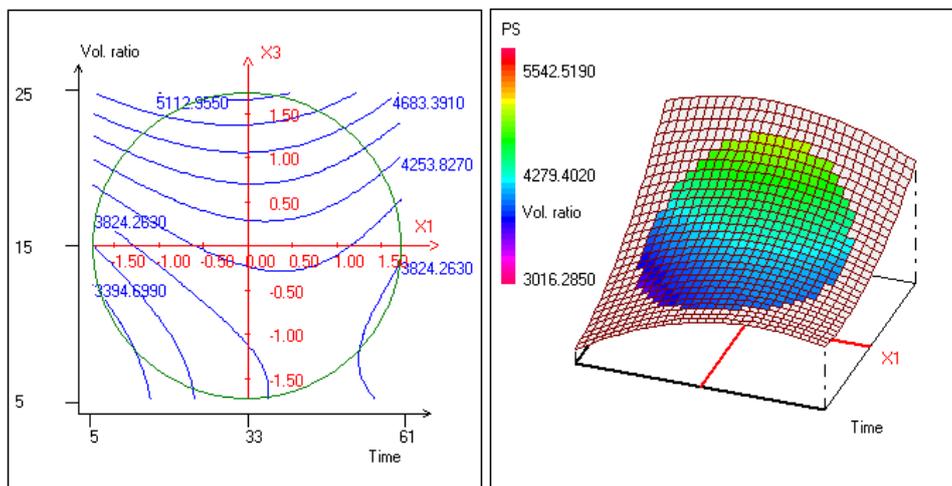


Figura 5.1.6. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para las LPCs: (a) tiempo de extracción frente a la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando la temperatura a 15°C : y (b) temperatura frente a la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando el tiempo de extracción en 33 minutos.

Las superficies de respuesta correspondientes a la familia de las PSs (Figura 5.1.7) indicaron que cuando se empleaban mayores proporciones de volumen disolvente/muestra aumentaba la señal asociada a esta familia de lípidos, independientemente del tiempo de extracción empleado. Consiguiendo una mayor recuperación cuando la extracción se realizaba a temperatura ambiente.

(a)



(b)

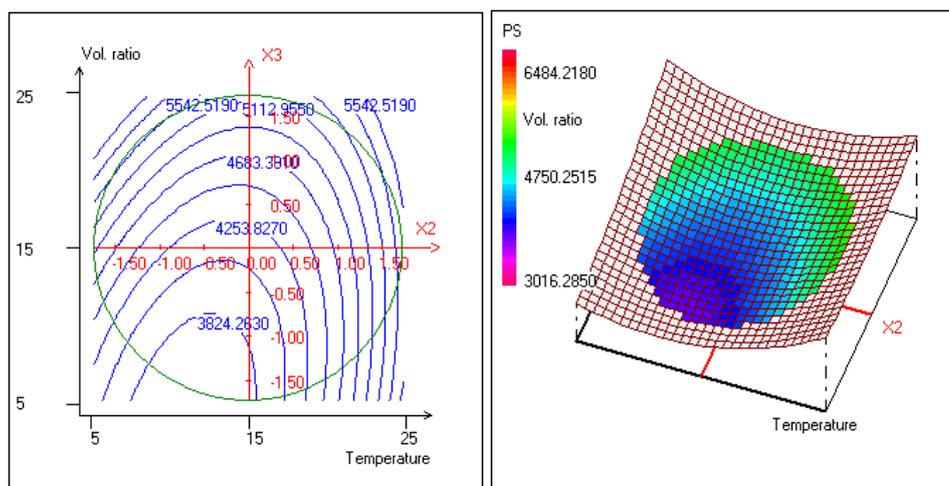


Figura 5.1.7. Superficies de respuesta de todas las interacciones significativas para las PSs: (a) tiempo de extracción frente a la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando la temperatura a 15°C : y (b) temperatura frente a la relación de $V_{\text{extractor}}/V_{\text{muestra}}$, fijando el tiempo de extracción en 33 minutos.

Debido a los diferentes comportamientos que presentaron las siete familias lipídicas con respecto a los factores relevantes en su extracción, fue difícil encontrar unas condiciones comunes y óptimas de extracción asistida por ultrasonidos.

Sin embargo, el objetivo de este estudio fue proporcionar un método analítico universal que permitiera adquirir una exhaustiva huella de lípidos procedentes de muestras de plasma sanguíneo humano, independientemente de la familia de lípidos en cuestión. Por lo tanto, se tuvo que establecer un compromiso óptimo con el propósito de que todas las respuestas tuviesen un valor aceptable. Cuando se deben optimizar múltiples respuestas de forma simultánea, la metodología de las funciones de deseabilidad permite encontrar el compromiso óptimo maximizando una función, la deseabilidad global D , que representa la calidad del compromiso.

En esta metodología, cada respuesta individual se transforma en una función adimensional, denominada función de deseabilidad parcial, d_i , que varía de cero (respuesta indeseable) a uno (respuesta óptima). Dependiendo del objetivo del estudio, los valores óptimos de respuesta y la forma más apropiada de la función de deseabilidad deben de seleccionarse para cada una de las respuestas. Una vez definidas las funciones de deseabilidad parcial, es posible calcular la función de deseabilidad global D mediante el cálculo de la media geométrica ponderada de las n funciones de deseabilidad individuales [16]. Por medio de la siguiente expresión (Ecuación 2):

$$D = \left[\prod_{i=1}^n d_i^{p_i} \right]^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

donde p_i es la ponderación de la i_{th} , siendo éstas ponderaciones normalizadas, de modo que su sumatorio sea igual a la unidad. La ponderación de las funciones de deseabilidad parcial hace que la optimización tenga en cuenta la importancia relativa de cada respuesta. El análisis de la forma que posee la función de deseabilidad global permite localizar la región donde la función se aproxima más a uno, indicando cuáles son las condiciones óptimas para el compromiso que queremos alcanzar.

En esta investigación, la función de deseabilidad global se calculó definiendo funciones de deseabilidad parcial lineal para cada respuesta. Al construir estas funciones, la respuesta mínima aceptable se fijó en el valor mínimo de la respuesta obtenida, mientras que el valor máximo de la respuesta obtenida se estableció como la recuperación óptima. Puesto que cada familia de lípidos estudiada era igual de importante que las otras, el peso de sus funciones de deseabilidad parcial se fijó en 1.

Las condiciones óptimas de extracción de lípidos asistida por energía ultrasónica alcanzadas por la deseabilidad global cercana a 1 fueron fijadas en 15°C con una relación de volumen de 25 y un tiempo de extracción de 30 minutos. Estas condiciones experimentales permiten la determinación robusta de las múltiples clases de lípidos inherentes a las muestras de plasma, mostrando altas recuperaciones de extracción para todos los lípidos estudiados.

5.1.1.5. Comparativa de los tres métodos de extracción evaluados: MTBE-US, DCM y MTBE-Vortex

La selección del método con el que se lleva a cabo la preparación de muestra afecta directamente en el perfil lipídico que se va a extraer, así como en la calidad de los datos, llegando incluso a alterar los resultados obtenidos [2]. Por esta razón, se va a efectuar una comparación entre distintos métodos de extracción con el objetivo de analizar las ventajas y debilidades que presenta el nuevo protocolo propuesto para la extracción de lípidos (MTBE-USAE).

Si se comparan las metodologías que tienen en común el empleo del mismo disolvente, MTBE, se deben de examinar tanto la técnica que emplea agitación por Vortex [1, 7] como la asistida por agitación ultrasónica. La técnica asistida por Vortex necesita mayores tiempos de extracción si se comparan con los tiempos del MTBE-USAE, ya que requiere de 1 hora frente a los 30 minutos proporcionados por US. La reducción del tiempo de extracción a la mitad podría producir importantes beneficios económicos para los laboratorios clínicos.

Por otro lado, se efectuó una comparación de los siguientes métodos de extracción: MTBE-US, MTBE-Vortex y el método modificado de Bligh-Dyer, centrando este examen en la eficacia de la extracción, pudiendo ser analizada por la repetibilidad de los experimentos, la recuperación de los patrones internos y el número de picos detectados.

La recuperación se estimó para estas tres metodologías mediante la comparación de las áreas de los patrones internos de los lípidos antes y después de la extracción de los mismos, siendo evaluadas estas capacidades extractivas tanto en modo de ionización positivo como negativo. Para efectuar esta comparación cada extracción se realizó por triplicado y cinco inyecciones se llevaron a cabo de cada una de las muestras.

Como se muestra en la Tabla 5.1.4, entre los datos obtenidos con los tres métodos se puede observar que los valores de recuperación más altos para PE, SM, TG y FA fueron obtenidos con el nuevo protocolo basado en el uso combinado de MTBE y energía ultrasónica. Sólo los valores de recuperación para la PC fueron ligeramente mayores cuando se empleó el método DCM. Debe tenerse en cuenta que para todos los patrones de lípidos, el protocolo MTBE-US proporciona recuperaciones más altas que las logradas por la metodología donde se emplea MTBE asistida por Vortex. En el caso del FA y la SM, se obtuvo un notable aumento en las recuperaciones cuando se utilizó el nuevo método MTBE-US en lugar del protocolo de extracción de DCM (pasando del 33 al 80% y del 70 al 86%, respectivamente). Por otro lado, los valores de recuperación de PE y TG también mostraron un notable aumento cuando se comparó el protocolo propuesto en este trabajo con el método que combina MTBE-Vortex (transformando el 60 al 92% y el 52 al 70%, respectivamente).

Por otro lado, las mayores recuperaciones que se pueden perciben con los datos de la Tabla 5.1.4 también son observadas en los cromatogramas de los extractos lipídicos de plasma obtenidos en ambos modos positivos y negativos para cada método de extracción (Figura 5.1.8), así como en los EICs correspondientes a los lípidos seleccionados para elaborar las superficies de respuestas de cada familia lipídica en el diseño experimental (Figura 5.1.8).

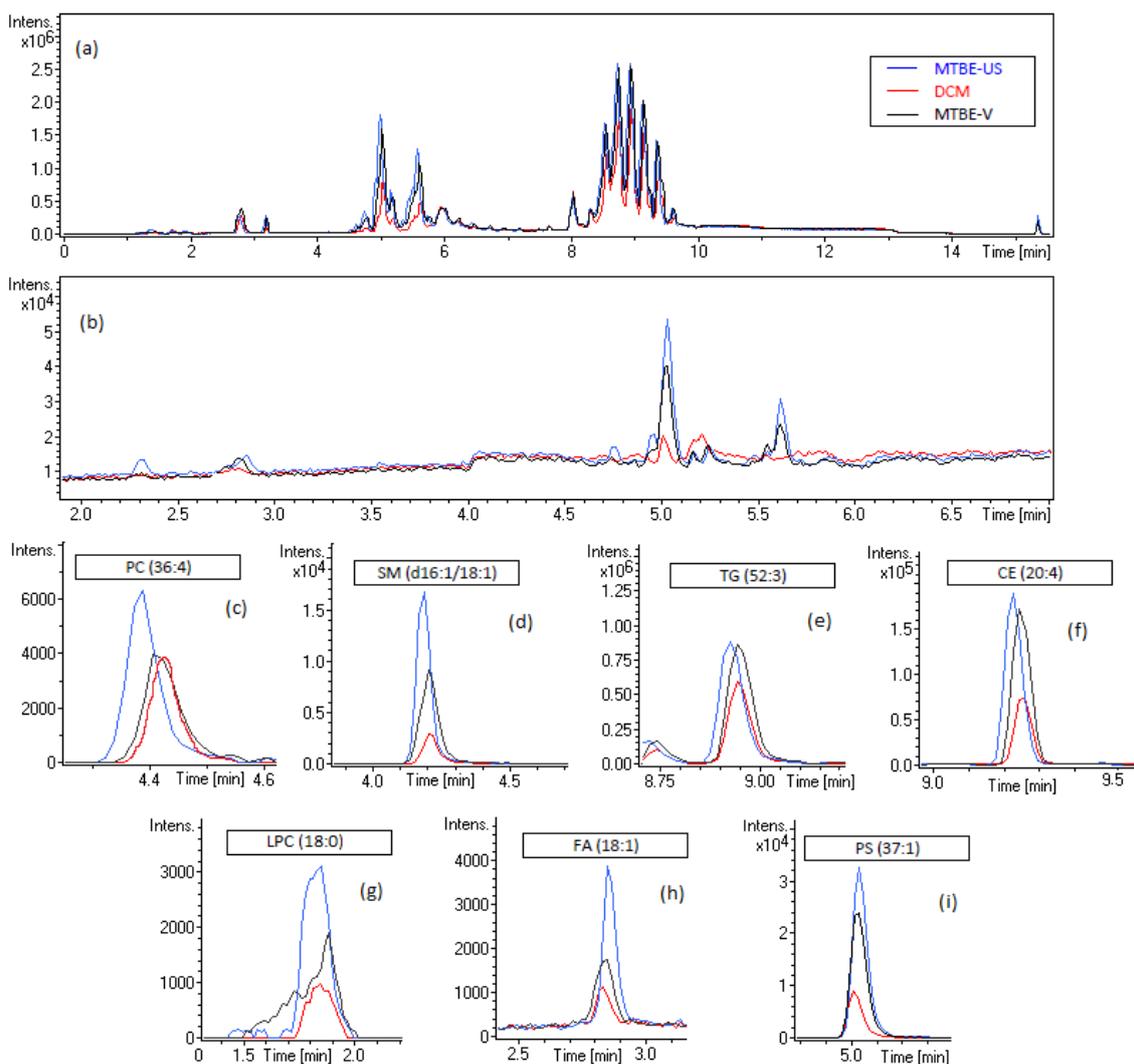


Figura 5.1.8. Comparativa de los cromatogramas de los extractos lipídicos en plasma, en modo positivo (a) y en modo negativo (b) como de los picos de ciertos lípidos pertenecientes a distintas familias (c) PC (36:4), (d) SM (d16:1/18:1), (e) TG (52:3), (f) CE(20:4), (g) LPC (18:0), (h) FA (18:1), and (i) PS (37:1) para cada uno de los métodos de extracción evaluados (MTBE US, DCM y MTBE Vortex).

La repetibilidad de los métodos estudiados se evaluó mediante la realización de cinco extracciones en el mismo día, a las cuales se adicionaron los patrones internos. Para obtener la variación del área de los picos de los lípidos seleccionados se empleó la relación del área del pico del lípido con respecto al patrón interno de la misma familia que el lípido elegido.

Para analizar la repetibilidad de los métodos se emplearon lípido de todas las familias lipídicas, evaluándose la repetibilidad en ambos modos de ionización, modo positivo y modo negativo. Las desviaciones estándar relativas (RSDs) mostradas en la Tabla 5.1.5 plasman los diferentes valores obtenidos según la metodología de extracción empleada: en el método MTBE-US alcanza unos valores de 2.39 y 5.55%, mientras que para los métodos DCM y MTBE

con Vortex consigue unos valores de 2.82 a 14.46% y de 4.81 a 12.95%, respectivamente.

Ante estos valores se puede concluir que el método MTBE-US en comparación con las otras metodologías permite reducir el sesgo asociado con la etapa de preparación de muestras, ya que obtiene los valores más bajos de las desviaciones estándar relativas.

Para continuar el estudio comparativo se evaluó tanto la cantidad de picos detectados como la de lípidos identificados en cada una de las tres metodologías, realizándose un estudio en profundidad del perfil de los lípidos en las muestras de plasma humano. El cromatograma obtenido con el método de extracción MTBE-US estaba compuesto por más de 800 picos, valor altamente significativo en comparación a los 685 picos detectados cuando se utilizó como disolvente extractor el DCM y a los 707 picos detectados cuando se utilizó la extracción basada en la combinación de MTBE y Vortex (Tabla 5.1.6). Con respecto al número de lípidos identificados también este método de extracción mostró los niveles más altos, siendo esta cantidad de: 352 lípidos si se utiliza MTBE-US, 270 lípidos utilizando el método modificado por Bligh-Dyer y 273 lípidos cuando se utilizó como disolvente el MTBE en combinación con Vortex.

Por último, se quisieron determinar los lípidos que sólo habían sido detectados con las metodologías de extracción estudiadas (Tablas 5.1.7-5.1.13). En concreto, las Tablas 5.1.7-5.1.10 muestran los lípidos que se identificaron con el método de extracción MTBE-US propuesto y no se encontraron en los otros métodos de extracción estudiados. Las Tablas 5.1.11-5.1.13 incluyen a los lípidos identificados que fueron encontrados con los métodos de Bligh-Dyer modificado y MTBE-Vortex y no se encontraron con el método propuesto. Con los resultados presentes, queda más que demostrado que el método de extracción MTBE-US era capaz de extraer e identificar más lípidos, traduciéndose estos resultados en un mayor rendimiento de la etapa de extracción.

Tabla 5.1.4. Estudio comparativo de las recuperaciones según los métodos evaluados (n=3).

Método	Recuperaciones \pm RSD (%)				
	PC(12:0/12:0)	PE(16:0/16:0)	SM(d18:1/c6:0)	TG(17:0/17:0/17:0)	FA(13:0)
MTBE-US	91.36 \pm 1.54	92.07 \pm 5.64	86.32 \pm 2.67	69.80 \pm 2.31	79.99 \pm 1.57
DCM	98.26 \pm 3.57	95.15 \pm 4.72	69.54 \pm 3.50	62.82 \pm 13.12	33.39 \pm 13.59
MTBE-Vortex	97.88 \pm 6.52	60.20 \pm 7.15	79.79 \pm 7.94	52.46 \pm 5.32	81.91 \pm 3.12

Tabla 5.1.5. Estudio comparativo de la repetibilidad de los métodos evaluados (n=5).

Método	Repetibilidad (RSD%)						
	PC(36:4)	SM(d16:1/18:1)	TG(52:3)	CE(20:4)	LPC(18:0)	FA(18:1)	PS(37:1)
MTBE-US	2.91	5.55	4.32	5.32	2.39	5.09	3.72
DCM	4.28	9.32	2.84	5.08	2.82	14.46	9.79
MTBE-Vortex	7.12	4.81	13.12	11.12	12.95	7.23	8.32

Tabla 5.1.6. Número de picos detectados y lípidos identificados con los métodos evaluados.

Modo de ionización	Método de Extracción	Picos detectados	Lípidos identificados
Modo Positivo	MTBE-US	557	249
	DCM	432	211
	MTBE-Vortex	422	212
Modo Negativo	MTBE-US	280	103
	DCM	253	59
	MTBE-Vortex	285	61

Tabla 5.1.7. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-USAE y no encontrados con el método DCM (modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	688.5084	4.7666	688.5061	3.2684	DG(42:10)	C ₄₅ H ₆₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		642.5185	6.1984	642.5217	-4.9773	DG(38:5)	C ₄₁ H ₇₀ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	796.6473	8.1952	796.6575	-12.8014	TG(48:5)	C ₅₁ H ₈₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		822.6633	8.2941	822.6731	-11.9210	TG(50:6)	C ₅₃ H ₉₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		704.6030	8.3231	704.5949	11.4924	TG(41:2)	C ₄₄ H ₈₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		932.7672	8.5442	932.7827	-16.5996	TG(58:7)	C ₆₁ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		664.5534	8.6745	664.5636	-15.3468	TG(38:1)	C ₄₁ H ₇₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		966.8438	8.7418	966.8609	-17.6987	TG(60:4)	C ₆₃ H ₁₁₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		674.5875	9.2445	674.5843	4.6528	TG(P-40:2)	C ₄₃ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
898.7808	9.2719	898.7983	-19.4621	TG(55:3)	C ₅₈ H ₁₀₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺		
Esteroles	CE	674.5980	9.4475	674.5996	-2.4732	CE(20:3)	C ₄₇ H ₇₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	Cer	813.6846	6.4617	813.7053	-25.0084	GlcCer(d18:0/24:0)	C ₄₈ H ₉₅ NO ₈	[M+H] ⁺
		731.6103	5.3753	731.6188	-11.5974	CerP(d18:0/24:0)	C ₄₂ H ₈₆ NO ₆ P	[M+H] ⁺
		699.5567	4.7522	699.5644	-10.9134	GlcCer(d18:1/16:0)	C ₄₀ H ₇₇ NO ₈	[M+H] ⁺
Glicerofosfolípidos	LPG	524.3598	1.9519	524.3473	23.8626	LPG(P-20:0)	C ₂₆ H ₅₃ O ₈ P	[M+H] ⁺
	PA	772.5901	5.3332	772.5977	-9.7850	PA(41:1)	C ₄₄ H ₈₅ O ₈ P	[M+H] ⁺
	PC	837.6173	5.9433	837.6243	8.3652	PC(40:4)	C ₄₈ H ₈₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		831.5703	5.5290	831.5773	8.3912	PC(40:7)	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		793.5595	4.8242	793.5617	-2.7064	PC(37:5)	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		743.5667	5.0147	743.5824	21.0477	PC(P-34:1)	C ₄₂ H ₈₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	PE	731.5476	4.9020	731.5460	-2.1608	PE(35:1)	C ₄₀ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		807.5749	5.0009	807.5773	2.9491	PE(41:5)	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		739.5133	5.0451	739.5147	-1.8796	PE(36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺
734.5643		5.4020	734.5569	10.0828	PE(34:1)	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ O ₈ P	[M+H] ⁺	

Tabla 5.1.8. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-USAE y no encontrados con el método DCM (modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Ácidos Grasos	FA	256.2403	2.7369	256.2407	-1.7608	FA(16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻
	LPS	567.3499	1.5020	567.3541	-7.3407	LPS(21:0)	C ₂₇ H ₅₄ NO ₉ P	[M-H] ⁻
Glicerofosfolípidos	PS	885.5330	4.8198	885.5525	-22.0449	PS(44:9)	C ₅₀ H ₈₀ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
		859.6775	6.4550	859.6671	12.0605	PS(O-42:1)	C ₄₈ H ₉₄ NO ₉ P	[M-H] ⁻
		821.5585	4.9494	821.5576	1.0195	PS(P-40:5)	C ₄₆ H ₈₀ NO ₉ P	[M-H] ⁻
		813.5699	5.3487	813.5525	21.3431	PS(38:3)	C ₄₄ H ₈₀ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
		777.5981	5.3809	777.5889	11.7998	PS(O-36:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₉ P	[M-H] ⁻
		777.5449	4.9009	777.5525	-9.8426	PS(35:0)	C ₄₁ H ₈₀ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
	PA	802.5449	5.0339	802.5518	-8.5859	PA(44:7)	C ₄₇ H ₇₉ O ₈ P	[M-H] ⁻
		752.5487	5.9890	752.5361	16.6492	PA(40:4)	C ₄₃ H ₇₇ O ₈ P	[M-H] ⁻
		744.5883	5.2159	744.6038	-20.8547	PA(O-40:1)	C ₄₃ H ₈₅ O ₇ P	[M-H] ⁻
		662.4993	5.9722	662.4892	15.2252	PA(33:0)	C ₃₆ H ₇₁ O ₈ P	[M-H] ⁻
	PC	853.5744	5.0048	853.5838	-11.1020	PC(42:10)	C ₄₇ H ₈₄ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
	PE	823.6012	4.9451	823.6096	-10.2557	PE(42:4)	C ₄₇ H ₈₆ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		819.5605	5.0335	819.5783	-21.7883	PE(42:6)	C ₄₇ H ₈₂ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		779.5592	5.4046	779.5471	15.5241	PE(39:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		767.5393	5.6935	767.5470	-10.0598	PE(38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		751.5436	5.9892	751.5521	-11.3038	PE(O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M-H] ⁻
		743.5398	5.7738	743.5470	-9.6700	PE(36:2)	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		723.5136	5.4373	723.5208	-9.9422	PE(P-36:4)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₇ P	[M-H] ⁻
	PG	860.6691	6.9555	860.6511	20.8408	PG(42:1)	C ₄₈ H ₉₃ O ₁₀ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.8. (Continúa)

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PG	858.6194	5.7749	858.6355	-18.6959	PG(42:2)	C ₄₈ H ₉₁ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		856.6391	6.0400	856.6198	22.5486	PG(42:3)	C ₄₈ H ₈₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		848.6700	4.7925	848.6875	-20.5831	PG(O-42:0)	C ₄₈ H ₉₇ O ₉ P	[M-H] ⁻
		776.5946	5.3830	776.5936	1.3155	PG(O-37:1)	C ₄₃ H ₈₅ O ₉ P	[M-H] ⁻
		774.5802	4.8678	774.5780	2.8848	PG(O-37:2)	C ₄₃ H ₈₃ O ₉ P	[M-H] ⁻
		750.5727	4.7486	750.5780	-7.0666	PG(O-35:0)	C ₄₁ H ₈₃ O ₉ P	[M-H] ⁻
		720.5349	4.0948	720.5310	5.4590	PG(O-33:1)	C ₃₉ H ₇₇ O ₉ P	[M-H] ⁻
		688.4301	5.5719	688.4320	-2.8453	PG(30:3)	C ₃₆ H ₆₅ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
	PI	862.5480	4.8851	862.5576	-11.2224	PI(36:2)	C ₄₅ H ₈₃ O ₁₃ P	[M-H] ⁻
		848.5808	5.6197	848.5784	2.7579	PI(P-36:1)	C ₄₅ H ₈₅ O ₁₂ P	[M-H] ⁻
		820.5495	5.0198	820.5471	2.8810	PI(P-34:1)	C ₄₃ H ₈₁ O ₁₂ P	[M-H] ⁻
		768.5289	5.6917	768.5158	17.0638	PI(O-30:0)	C ₃₉ H ₇₇ O ₁₂ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.9. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-USAE y no encontrados con el método MTBE-Vortex (modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	614.5057	6.3640	614.4904	24.9167	DG(36:5)	C ₃₉ H ₆₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	670.5293	8.0091	670.5166	18.9715	TG(39:5)	C ₄₂ H ₇₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		796.6473	8.1952	796.6575	-12.8014	TG(48:5)	C ₅₁ H ₈₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		822.6633	8.2941	822.6731	-11.9210	TG(50:6)	C ₅₃ H ₉₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		704.6030	8.3231	704.5949	11.4924	TG(41:2)	C ₄₄ H ₈₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺

Tabla 5.1.9. (Continúa)

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización	
Glicerolípidos	TG	932.7672	8.5442	932.7827	-16.5996	TG(58:7)	C ₆₁ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	
		966.8438	8.7418	966.8609	-17.6987	TG(60:4)	C ₆₃ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	
		674.5647	9.2404	674.5479	24.9368	TG(39:3)	C ₄₂ H ₇₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	
		898.7808	9.2719	898.7983	-19.4621	TG(55:3)	C ₅₈ H ₁₀₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	
		970.8713	9.9188	970.8922	-21.5963	TG(60:2)	C ₆₃ H ₁₁₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	
Esfingolípidos	Cer	649.6372	7.6019	649.6368	0.6828	Cer(d18:0/24:1)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₃	[M+H] ⁺	
Glicerofosfolípidos	LPC	521.3492	1.5112	521.3476	3.0463	LPC(18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
		519.3336	1.1923	519.3320	3.0512	LPC(18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
	PA	674.5362	4.1049	674.5245	17.3942	PA(P-35:0)	C ₃₈ H ₇₅ O ₇ P	[M+H] ⁺	
		700.5519	4.2198	700.5402	16.7685	PA(P-37:1)	C ₄₀ H ₇₇ O ₇ P	[M+H] ⁺	
		724.5158	4.7566	724.5038	16.6419	PA(38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+H] ⁺	
		740.5206	5.0451	740.5351	-19.4862	PA(39:3)	C ₄₂ H ₇₇ O ₈ P	[M+H] ⁺	
		732.5511	5.0451	732.5664	-20.8780	PA(38:0)	C ₄₁ H ₈₁ O ₈ P	[M+H] ⁺	
		630.4637	6.3640	630.4619	2.8741	PA(P-32:1)	C ₃₅ H ₆₇ O ₇ P	[M+H] ⁺	
	PC	800.6469	6.7170	800.6290	22.3540	PA(43:1)	C ₄₆ H ₈₉ O ₈ P	[M+H] ⁺	
		837.6173	5.9433	837.6243	8.3652	PC(40:4)	C ₄₈ H ₈₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
		803.5397	4.8092	803.5460	-7.8140	PC(38:7)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
		793.5595	4.8242	793.5617	-2.7064	PC(37:5)	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
		731.5893	5.3765	731.5824	9.4294	PC(P-33:0)	C ₄₁ H ₈₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
		PE	771.5768	5.3289	771.5773	-0.5563	PE(35:2)	C ₄₃ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺
			813.6730	6.4550	813.6606	15.2934	PE(O-42:2)	C ₄₇ H ₉₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺
			739.5133	5.0451	739.5147	-1.8796	PE(36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺
PG	772.5795	5.3324	772.5977	-23.4770	PG(P-37:2)	C ₄₃ H ₈₁ O ₉ P	[M+H] ⁺		

Tabla 5.1.9. (Continúa)

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PG	808.5747	5.1940	808.5613	16.5519	PG(O-40:6)	C ₄₆ H ₈₁ O ₉ P	[M+H] ⁺
		808.5784	5.5417	808.5614	21.0256	PG(P-40:5)	C ₄₆ H ₈₁ O ₉ P	[M+H] ⁺
	PI	936.7222	8.3583	936.7026	21.0074	PI(O-42:0)	C ₅₁ H ₁₀₁ O ₁₂ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.10. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-USAE y no encontrados con el método MTBE-Vortex (modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	LPC	565.3650	0.7008	565.3749	-17.5475	LPC(21:0)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₈ P	[M-H] ⁻
	PS	885.6685	4.8229	885.6464	25.0132	PS(43:2)	C ₄₉ H ₉₂ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
		853.5751	5.0078	853.5838	-10.2497	PS(41:4)	C ₄₇ H ₈₄ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
		767.4840	4.9266	767.4743	12.5453	PS(35:5)	C ₄₁ H ₇₀ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻
		693.5098	5.5506	693.4950	21.3348	PS(O-30:0)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₉ P	[M-H] ⁻
	PE	823.6012	4.9451	823.6096	-10.2557	PE(42:4)	C ₄₇ H ₈₆ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		685.4522	5.5602	685.4688	-24.2149	PE(32:3)	C ₃₇ H ₆₈ NO ₈ P	[M-H] ⁻
	PG	860.6691	6.9555	860.6511	20.8408	PG(42:1)	C ₄₈ H ₉₃ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		858.6194	5.7749	858.6355	-18.6959	PG(42:2)	C ₄₈ H ₉₁ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		686.4154	5.5519	686.4164	-1.5563	PG(30:4)	C ₃₆ H ₆₃ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
	PI	850.5882	5.5270	850.5940	-6.8384	PI(O-36:1)	C ₄₅ H ₈₇ O ₁₂ P	[M-H] ⁻
		846.5211	4.7973	846.5263	-6.2082	PI(35:3)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₃ P	[M-H] ⁻
		768.4892	4.9304	768.4946	-7.0716	PI(29:0)	C ₃₈ H ₇₃ O ₁₃ P	[M-H] ⁻
		898.5430	5.6223	898.5576	-16.2290	PI(39:5)	C ₄₈ H ₈₃ O ₁₃ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.11. Lípidos identificados con el método de extracción DCM y no encontrados con el método MTBE-USAE (modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	MG	384.3206	1.4175	384.3234	-7.3363	MG(20:1)	C ₂₃ H ₄₄ O ₄	[M+NH ₄] ⁺
	DG	650.5869	5.3266	650.5843	3.9800	DG(38:1)	C ₄₁ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	662.5754	8.5237	662.5843	-13.4896	TG(38:2)	C ₄₁ H ₇₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		706.6144	8.9595	706.6105	5.5384	TG(41:1)	C ₄₄ H ₈₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		792.7145	9.0097	792.7201	-7.1419	TG(47:0)	C ₅₀ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Esteroles	CE	654.5446	9.3953	654.5581	-20.7196	CE(16:0(OH,Ke))	C ₄₃ H ₇₄ O ₄	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PC	783.5744	5.7424	783.5773	-3.6701	PC(36:3)	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.12. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-Vortex y no encontrados con el método MTBE-USAE (modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	650.5869	5.3276	650.5843	8.5911	DG(39:8)	C ₄₁ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	918.8428	9.8984	918.8609	-19.7449	TG(56:0)	C ₄₁ H ₆₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		792.7145	9.0097	792.7201	-7.1419	TG(47:0)	C ₅₀ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		760.6564	8.3018	760.6575	-1.4506	TG(45:2)	C ₄₈ H ₈₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		730.6238	8.3212	730.6105	18.2142	TG(43:3)	C ₄₆ H ₈₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		706.6144	8.9595	706.6105	5.5384	TG(41:1)	C ₄₄ H ₈₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		662.5684	8.5237	662.5843	-24.0492	TG(O-39:2)	C ₄₂ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PC	766.5479	5.7424	766.5507	-3.7386	PC(36:3)	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.13. Lípidos identificados con el método de extracción MTBE-Vortex y no encontrados con el método MTBE-USAE (modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	LPS	539.3199	1.3887	539.3228	-5.4272	LPS(19:0)	C ₂₅ H ₅₀ NO ₉ P	[M+H] ⁻
	PA	798.6335	5.0155	798.6144	23.8867	PA(43:2)	C ₄₆ H ₈₇ O ₈ P	[M+H] ⁻

5.1.1.6. Conclusiones

En este estudio, se desarrolló un método de extracción de lípidos utilizando como disolvente extractor MTBE asistido con US para poder posteriormente obtener las huellas lipídicas de muestras plasmáticas humanas utilizando LC-ESIqToF-MS.

Después de llevar a cabo la etapa de optimización, se puede concluir que la temperatura, el tiempo de extracción y la relación de volumen disolvente/muestra fueron factores determinantes que debían de ser controlados exhaustivamente en la etapa de extracción. El método desarrollado MTBE-US permitió aumentar la eficiencia de extracción comparando nuestra investigación con los métodos que previamente habían sido propuestos, ya que se obtuvieron recuperaciones en torno al 70% de los lípidos evaluados, a su vez permitió reducir el tiempo de extracción de 1 hora a 30 minutos y también el sesgo tomando valores las RSDs por debajo del 5.55% de los lípidos evaluados.

Además, el número de picos detectados fueron 837 y de lípidos identificados 352, mostrando una mayor significancia con respecto a los otros métodos de extracción. Teniendo en cuenta la velocidad, eficiencia, precisión, detectabilidad y compatibilidad del método con la automatización, el nuevo método propuesto podría presentarse como un método simple y universal para el perfilado de lípidos de alto rendimiento y, por lo tanto, ser fácilmente aplicado en laboratorios clínicos.

5.1.2. Conservación de muestras biológicas en laboratorios clínicos: Congelación-descongelación

5.1.2.1. Introducción

En los laboratorios clínicos, la mayoría de las muestras de plasma se almacenan en congeladores y permanecen en ese estado hasta su análisis, haciendo que sea la descongelación de las muestras la primera etapa clave en la obtención del perfil lipídico de muestras plasmáticas [17]. Sobre esta matriz y su manipulación, existe escasa información en forma de protocolos de actuación para minimizar el error analítico que se puede inducir y la variabilidad en las muestras [18]. Por este motivo, es imprescindible la estandarización de un protocolo de descongelación de muestras plasmáticas para obtener resultados reproducibles. Varias investigaciones se han realizado para analizar la influencia y el efecto de las condiciones de almacenamiento y del proceso de congelación en muestras biológicas sanguíneas, concretamente en observar cómo varía la composición de las mismas en estos procesos. Sin embargo, no se ha abordado una investigación exhaustiva sobre el procedimiento de descongelación [19], llevándose a cabo únicamente estudios de descongelación enfocados en evaluar la estabilidad plasmática o sérica durante el almacenamiento llevado a cabo en largos periodos de tiempo (ciclos de congelación/descongelación) [18-20]. Teniendo estas apreciaciones en cuenta se puede afirmar que rara vez se han analizado los efectos directos de la descongelación de plasma en investigaciones lipídicas centradas en el descubrimiento de biomarcadores [19]. Por esta razón, se requiere un protocolo estandarizado para esta etapa pre-analítica, ya que se ha demostrado que los perfiles de espectrometría están directamente relacionados con los procedimientos utilizados en la etapa de descongelación [21].

El objetivo de este estudio fue, por tanto, examinar en detalle las condiciones de descongelación que influyen en la calidad del análisis de la composición lipídica y establecer un protocolo bien definido para el análisis lipídico, logrando minimizar la variabilidad de los datos y tener esta etapa bajo control. Para abordar este estudio se utilizó el método analítico, desarrollado por este grupo de investigación e incluido en esta tesis doctoral, basado en la extracción de lípidos utilizando MTBE y energía ultrasónica combinado con LC-ESIqToF-MS para realizar el análisis exhaustivo de la huella lipídica de muestras de plasma sanguíneo humano [22]. Para realizar esta investigación en profundidad sobre la etapa de descongelación fue necesario determinar todos los parámetros que pueden tener un efecto significativo en la eficiencia del proceso como puede ser el método de descongelación, la temperatura de descongelación y el volumen de muestra. Por otra parte, una herramienta poderosa que se aplica con el objetivo de acelerar los procedimientos que se llevan a cabo en los procesos analíticos es la energía ultrasónica [23]. De ahí que se pensó que se podría utilizar esta técnica como metodología novedosa

en la descongelación. Para ello, se realizó un estudio comparativo de los protocolos que han sido utilizados para descongelar muestras de plasma con anterioridad y el método propuesto basado en el uso de energía ultrasónica [17-19, 24]. Para abordar esta comparación y la optimización de los diferentes factores que afectan al proceso de descongelación fue utilizada la herramienta quimiométrica de diseño de experimentos. Esta metodología permitió establecer las condiciones óptimas para asegurar la robustez y exactitud de la etapa pre-analítica propuesta con el fin de obtener una integra huella lipídica. Por ello, la información aportada en este estudio será de gran relevancia para los laboratorios clínicos al poder emplear un protocolo optimizado de una de las etapas de máxima importancia en el ámbito analítico y conseguir con su aplicación una adecuada exploración y selección de biomarcadores lipídicos.

5.1.2.2. Desarrollo experimental

En lo referente a reactivos, preparación de las soluciones lipídicas, almacenamiento y manipulación de las muestras de plasma, preparativa de las muestras y extracción de lípidos por el método MTBE-USAE se remite al Capítulo 4 (Desarrollo experimental). También en ese capítulo se ha incluido las condiciones experimentales utilizadas en la cromatografía líquida, el análisis de los datos y la identificación de lípidos.

5.1.2.3. Diseño experimental: Evaluación de las condiciones de descongelación

Para determinar la influencia de los factores que afectan al proceso de descongelación se aplicó un enfoque quimiométrico basado en el diseño de experimentos. A su vez, esta herramienta tiene la capacidad de determinar las condiciones óptimas de los principales parámetros que están involucrados en este proceso, permitiendo realizar una investigación exhaustiva de los efectos que genera una variación de estos factores. Tres factores son los determinantes en el proceso de descongelación, siendo el factor más destacado el del propio procedimiento utilizado para descongelar, ya que está directamente relacionado con los perfiles que se van a obtener en la espectrometría [21]. Otro de los factores a tener en cuenta en este proceso es la temperatura de descongelación, ya que esta propiedad física tiene la capacidad de alterar la estabilidad de los lípidos y, finalmente, el volumen de muestra que es una magnitud que está directamente relacionada con el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de descongelación y, en consecuencia, con la estabilidad de los lípidos. Para mostrar y resaltar cómo afectan estos tres factores en los procesos de descongelación en cualquier investigación lipídica, se realizó una comparación de los procedimientos de descongelación utilizados habitualmente en los laboratorios para descongelar muestras plasmáticas. Entre los procesos analizados se encuentra la utilización de baño de agua o mantener la muestra en contacto con aire, pudiéndose

llevar a cabo ambos procesos con agitación o sin ella [17-19, 24] y el nuevo método propuesto en este estudio basado en el empleo de energía ultrasónica.

El diseño de experimentos seleccionado, para determinar los efectos de los tres factores y sus interacciones a través de superficies de respuesta, fue un diseño experimental factorial a diferentes niveles (cinco niveles fueron establecidos para el método de descongelación, tres para la temperatura de descongelación y dos para el volumen de las muestras biológicas), constituyendo un total de 30 experimentos (Tabla 5.1.14). Todos estos experimentos se realizaron por triplicado y al azar con la finalidad de minimizar los efectos que podrían introducir sesgo.

Tabla 5.1.14. Matriz del diseño de experimentos.

N° Exp	Volumen (mL)	Temperatura (°C)	Método de descongelación
1	0.25	4	Baño de agua + Agitación
2	4.5	4	Baño de agua + Agitación
3	0.25	19	Baño de agua + Agitación
4	4.5	19	Baño de agua + Agitación
5	0.25	34	Baño de agua + Agitación
6	4.5	34	Baño de agua + Agitación
7	0.25	4	Baño de agua
8	4.5	4	Baño de agua
9	0.25	19	Baño de agua
10	4.5	19	Baño de agua
11	0.25	34	Baño de agua
12	4.5	34	Baño de agua
13	0.25	4	Contacto con aire + Agitación
14	4.5	4	Contacto con aire + Agitación
15	0.25	19	Contacto con aire + Agitación
16	4.5	19	Contacto con aire + Agitación
17	0.25	34	Contacto con aire + Agitación
18	4.5	34	Contacto con aire + Agitación
19	0.25	4	Contacto con aire
20	4.5	4	Contacto con aire
21	0.25	19	Contacto con aire
22	4.5	19	Contacto con aire
23	0.25	34	Contacto con aire
24	4.5	34	Contacto con aire
25	0.25	4	Ultrasonidos
26	4.5	4	Ultrasonidos
27	0.25	19	Ultrasonidos
28	4.5	19	Ultrasonidos
29	0.25	34	Ultrasonidos
30	4.5	34	Ultrasonidos

Para evaluar las condiciones experimentales requeridas en esta investigación sobre la etapa de descongelación, se utilizó un circulador refrigerado F25 de Julabo (Seelbach, Alemania) para llevar a cabo la descongelación gracias al contacto de la muestra con agua. Este equipo

permitió controlar tanto las condiciones del baño de agua como el establecimiento de una temperatura fija sobre este fluido para poder realizar el estudio a diferentes temperaturas. El baño de agua ultrasónico ULTS-6L0-001 suministrado por ATU Ultrasonidos (Valencia, España) se empleó para realizar la descongelación por la aplicación de energía ultrasónica y una incubadora refrigerada Innova 4340 (New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA) que incorpora un sistema de agitación para realizar los estudios de descongelación sometiendo a la muestra al contacto con aire.

El análisis del comportamiento de los lípidos se llevó a cabo construyendo superficies de respuestas. Para realizar estas superficies, se eligió un lípido representativo de cada una de las familias de lípidos (PC, SM, TG, FA, ChoE, LPC y PS). También se incluyeron como respuestas el número de picos detectados en cada una de las metodologías de descongelación analizadas y el tiempo transcurrido en cada proceso de descongelación.

5.1.2.4. Resultados y discusión

El objetivo de este estudio fue desarrollar y establecer un protocolo estandarizado de descongelación para estudios lipídicos. Para definir este protocolo fue necesario investigar los métodos que los laboratorios clínicos emplean en la descongelación de las muestras y analizar los diferentes parámetros que afectan al proceso de descongelación para optimizar su rendimiento, siempre teniendo como reto la obtención de un exhaustivo perfil lipídico.

Una vez elegidos los factores experimentales que presentaban una relación directa con los resultados, éstos fueron analizados quimiométricamente con la metodología de diseños de experimentos. Previamente a la etapa de optimización, se realizaron varios experimentos preliminares para definir el rango experimental de cada uno de los factores y los límites operativos de los equipos. Por este motivo, la temperatura se evaluó en el rango de 4 a 34°C y el volumen de muestra se estudió con dos capacidades diferentes: 0.25 y 4.5 mL. Para establecer el factor metodología del proceso de descongelación, se estudiaron las diferentes formas que tienen los laboratorios clínicos de realizar este proceso. Entre las metodologías que comúnmente son empleadas para descongelar las muestras se encuentra el baño de agua o simplemente el contacto con aire, pudiendo ser empleado en ambos casos la técnica de agitación para la homogeneización de la muestra mientras se produce la descongelación de la misma [17-19, 24-27]. Al realizar este estudio bibliográfico, se planteó una variante a las técnicas que emplean los laboratorios clínicos, una nueva metodología basada en la utilización de energía ultrasónica, que hasta la fecha no se había tenido en cuenta para la descongelación de plasma ni se había evaluado el efecto que puede ocasionar sobre los niveles lipídicos de las muestras, pero de la que sí habían sido

demostrados sus beneficios en la descongelación de alimentos [23, 28, 29]. Al incluir en el estudio comparativo esta metodología, se pasó a analizar el efecto que provocan estos cinco diferentes procedimientos de descongelación en el perfil lipídico de muestras plasmáticas humanas.

Primeramente se analizaron tres lípidos representativos de cada una de las familias lipídicas para conocer el comportamiento de los mismos. Como los tres lípidos de cada clase presentaban patrones de comportamiento similar, se optó por la selección de uno de ellos para aplicar el diseño de experimentos.

Como se indicó anteriormente, se seleccionaron diez respuestas en el diseño experimental para la optimización de los parámetros de los procesos que se iban a comparar: siete superficies de respuesta correspondían a un lípido de cada familia (una lista detallada de los lípidos seleccionados se presenta en la Tabla 5.1.15), dos superficies de respuestas fueron construidas con los picos detectados por cada una de las metodologías empleadas en el proceso de descongelación teniendo en cuenta los dos modos de ionización (modo de ionización positivo y negativo) y, por último, el tiempo transcurrido para llevar a cabo los procesos evaluados. Los resultados experimentales obtenidos para cada una de las respuestas se muestran en la Tabla 5.1.16.

Los resultados experimentales obtenidos se ajustaron a la función modelo con la siguiente expresión (Ecuación 3):

$$Y_j = b_0 + \sum_{i=1}^n b_{iA} X_{iA} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{iAjA} X_{iA} X_{jA} \quad (3)$$

donde X_{iA} corresponde a los i factores estudiados (volumen de la muestra, temperatura y metodología del proceso de descongelación) en sus A diferentes niveles; mientras que las respuestas Y_j fueron las áreas de los picos cromatográficos individuales de cada lípido seleccionado, el número de picos identificados en los dos modos de ionización y los minutos empleados en cada uno de los procesos de descongelación. Los coeficientes del modelo para cada una de las respuestas fueron estimados a partir de los datos experimentales mediante regresión lineal y validados por medio del análisis de la varianza ANOVA, usando para ello el software Nemrod-W.

Para todas las respuestas estudiadas, los modelos matemáticos planteados fueron analizados en detalle, ya que los modelos matemáticos propuestos eran significativos y explicaban correctamente el comportamiento de los compuestos en el dominio experimental seleccionado. Por lo tanto, los modelos fueron aceptados y los coeficientes para cada una de las respuestas se muestran en la Tabla 5.1.17.

Tabla 5.1.15. Lípidos seleccionados como respuestas en el diseño de experimentos.

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	t _r (min)	MW (Da)	ppm	Nombre	Fórmula	Ionización
Ácidos grasos	FA	282.2549	2.6369	282.2564	-5.4018	FA(18:1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻
Glicerolípidos	TG	828.7223	8.5257	828.7201	2.6547	TG(50:3)	C ₅₃ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Esteroles	CE	672.5845	9.0544	672.5839	0.8909	CE(20:4)	C ₄₇ H ₇₆ O ₂	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	SM	700.5519	4.0841	700.5514	0.7204	SM(d16:1/18:1)	C ₃₉ H ₇₇ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺
Glicerofosfolípidos	LPC	523.3664	1.9506	523.3633	5.9729	LPC(18:0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	PC	781.5612	4.9574	781.5617	-0.5923	PC(36:4)	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PS	803.5619	5.0317	803.5681	-7.7514	PS(37:1)	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.16. Áreas de los lípidos estudiados tras la integración, detección y duración de los procesos de descongelación, así como los valores de desviación estándar para cada experimento.

N° Exp	FA(18:1) (RSD%)	TG(50:3) (RSD%)	CE(20:4) (RSD%)	SM(d16:1/18:1) (RSD%)	LPC(18:0) (RSD%)
1	24024 (5.83)	484337 (1.52)	213798 (4.44)	35710 (1.30)	58772 (3.61)
2	22561 (8.91)	433110 (2.15)	148618 (9.74)	34028 (7.08)	58614 (2.54)
3	18005 (8.58)	394979 (6.17)	209378 (2.95)	24766 (1.57)	41582 (1.83)
4	16558 (0.21)	318200 (1.67)	140633 (4.15)	20769 (3.14)	33927 (4.15)
5	14927 (7.95)	299213 (8.61)	160254 (8.21)	15793 (2.78)	25046 (7.65)
6	13892 (4.53)	246122 (4.90)	110079 (4.42)	14491 (7.04)	22106 (2.00)
7	23021 (5.93)	455791 (2.45)	193226 (3.48)	36616 (2.54)	53292 (2.93)
8	21883 (7.59)	359429 (6.05)	133323 (1.61)	33969 (1.53)	56757 (7.98)
9	17102 (5.19)	356995 (1.31)	189965 (8.95)	23757 (8.97)	37550 (4.68)
10	15163 (4.80)	289801 (4.59)	124231 (7.96)	18759 (4.68)	30606 (7.69)
11	14667 (9.77)	280525 (1.64)	138379 (9.45)	15452 (3.48)	24918 (6.31)
12	13493 (8.21)	228005 (9.40)	83067 (8.17)	14313 (2.82)	21361 (3.43)

Tabla 5.1.16. (Continúa)

N° Exp	FA(18:1) (RSD%)	TG(50:3) (RSD%)	CE(20:4) (RSD%)	SM(d16:1/18:1) (RSD%)	LPC(18:0) (RSD%)
13	22157 (5.26)	425467 (8.48)	200993 (3.19)	33979 (7.30)	54162 (8.83)
14	20937 (6.48)	360637 (6.54)	136043 (3.06)	30729 (1.61)	54068 (2.88)
15	16316 (9.14)	376070 (2.25)	183075 (1.63)	22773 (1.61)	37043 (1.45)
16	14990 (2.77)	304448 (5.43)	117089 (7.18)	18132 (4.21)	30013 (9.01)
17	14317 (1.35)	282478 (8.39)	104754 (1.47)	13094 (8.69)	26088 (9.85)
18	13157 (9.00)	251399 (7.71)	96857 (2.74)	12628 (4.96)	23968 (3.98)
19	21282(9.35)	366078 (2.96)	192967 (3.69)	30900 (6.45)	54066 (6.62)
20	19904(8.20)	310793 (4.64)	145923 (8.61)	31882 (5.31)	53774 (7.80)
21	15622(8.50)	331479 (3.66)	170589 (4.74)	16113 (7.93)	27916 (4.40)
22	14680(7.35)	286252 (6.87)	119287 (5.62)	15154 (1.70)	22996 (9.06)
23	13898(9.42)	243410 (6.94)	103126 (6.22)	12310 (2.56)	23154 (9.47)
24	12793(8.56)	241245 (9.41)	96423 (6.65)	11784 (4.75)	17966 (8.65)
25	23020(4.69)	521996 (3.96)	226714 (1.83)	37073 (8.09)	66961 (4.89)
26	22888(5.39)	459394 (8.76)	185865 (6.43)	35246 (4.10)	59697 (3.50)
27	20654(3.58)	394067 (6.58)	196130 (4.51)	26861 (5.63)	46013 (8.21)
28	19113(5.15)	310951 (3.48)	134042 (3.08)	23414 (4.63)	37937 (6.67)
29	15396(3.89)	328856 (2.33)	189676 (3.63)	17067 (5.88)	26962 (1.83)
30	13923(8.56)	279092 (6.30)	112899 (2.94)	15007 (8.70)	22679 (5.77)
N° Exp	PC(36:4) (RSD%)	PS(37:1) (RSD%)	Picos (+) detectados (RSD%)	Picos (-) detectados (RSD%)	Duración (min) (RSD%)
1	927310 (3.06)	60372 (4.34)	966 (5.32)	474 (4.01)	10.5 (0.00)
2	886559 (4.73)	56020 (6.43)	901 (4.23)	463 (6.12)	43.7 (0.77)
3	582010 (6.66)	51526 (8.33)	853 (1.32)	385 (5.64)	2.50 (0.00)
4	572894 (3.03)	47268 (1.08)	832 (8.25)	369 (6.31)	9.40 (4.45)

Tabla 5.1.16. (Continúa)

N° Exp	PC(36:4) (RSD%)	PS(37:1) (RSD%)	Picos (+) detectados (RSD%)	Picos (-) detectados (RSD%)	Duración (min) (RSD%)
5	452421 (9.02)	37994 (7.41)	716 (4.51)	302 (8.34)	1.40 (0.00)
6	371454 (4.52)	34128 (4.25)	654 (6.34)	291 (2.14)	4.90 (1.33)
7	867100 (7.76)	58985 (7.28)	922 (9.33)	434 (4.57)	13.0 (0.00)
8	840203 (4.74)	55747 (4.11)	871 (3.10)	428 (2.98)	57.8 (0.44)
9	575506 (9.14)	49152 (6.97)	840 (5.49)	363 (7.13)	2.80 (0.00)
10	521458 (5.48)	45234 (1.08)	809 (6.23)	353 (3.95)	13.7 (2.11)
11	452594 (5.34)	36841 (9.80)	693 (2.47)	297 (4.21)	1.50 (0.00)
12	371249 (5.01)	32667 (7.99)	652 (2.35)	285 (7.36)	6.80 (2.19)
13	873100 (6.99)	61861 (4.63)	903 (8.64)	411 (2.64)	43.0 (0.00)
14	832491 (2.18)	57150 (9.29)	864 (3.14)	404 (1.15)	153.0 (0.65)
15	546852 (5.12)	51797 (6.07)	833 (5.39)	354 (6.97)	7.50 (0.00)
16	475353 (2.86)	47743 (4.53)	784 (1.34)	341 (3.33)	32.8 (0.67)
17	426005 (4.22)	38175 (3.28)	673 (8.15)	283 (4.61)	4.50 (0.00)
18	361112 (8.31)	34840 (9.47)	630 (4.44)	268 (1.97)	15.3 (1.41)
19	838958 (8.89)	59635 (8.51)	894 (5.65)	409 (2.01)	45.0 (0.00)
20	802803 (5.38)	56635 (9.20)	846 (2.34)	397 (5.11)	160 (0.71)
21	534192 (9.47)	49348 (9.25)	806 (9.65)	338 (9.11)	8.50 (0.00)
22	396191 (2.39)	46363 (3.42)	761 (5.21)	332 (3.17)	35.8 (0.59)
23	362516 (3.25)	37488 (5.34)	661 (4.67)	272 (5.22)	5.00 (0.00)
24	334667 (5.60)	34588 (9.74)	627 (8.33)	251 (8.04)	16.3 (1.56)
25	978360 (8.88)	62982 (5.62)	1022 (7.14)	489 (6.46)	4.50 (0.00)
26	923589 (1.83)	58736 (1.27)	956 (3.31)	482 (2.44)	14.6 (2.05)
27	593047 (9.18)	52643 (3.90)	887 (7.12)	392 (7.32)	2.20 (0.00)
28	578365 (4.39)	48019 (6.12)	865 (7.93)	382 (5.88)	8.30 (3.07)
29	468298 (6.68)	40045 (3.52)	740 (2.15)	311 (9.01)	1.20 (0.00)
30	385863 (2.69)	35981 (8.39)	689 (4.86)	303 (3.21)	4.70 (0.98)

Tabla 5.1.17. Coeficientes del modelo para cada una de las respuestas.

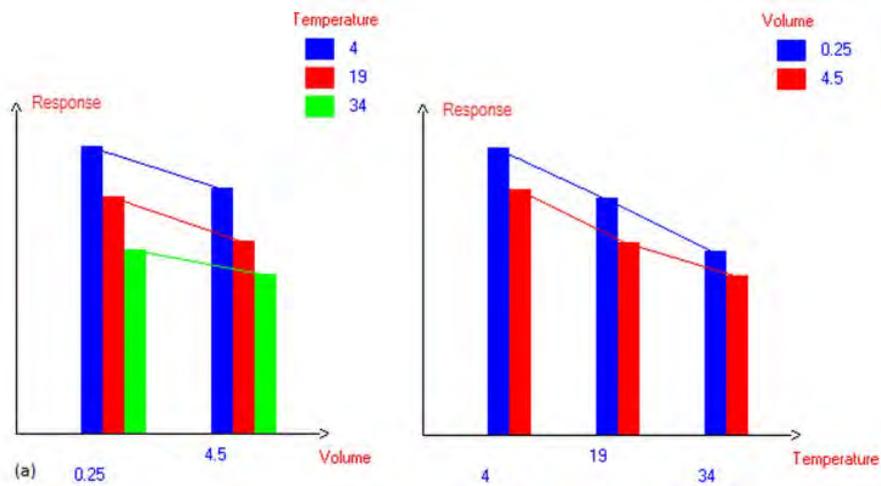
Coeficientes	FA	TG	CE	SM	LPC	PC	PS	Picos (+) detectados	Picos (-) detectados
b0	17684	340561	151874	23070	38354	604417	47999	805	362
A1	621	28618	26327	1080	1923	27467	1924	22	6
A2	-621	-28618	-26327	-1080	-1923	-27467	-1924	-22	-6
B1	4501	76737	25570	10896	18726	272630	10814	110	77
B2	-863	-4237	6568	-2020	-3796	-66831	911	22	-1
B3	-3637	-72500	-32138	-8876	-14929	-205799	-11724	-132	-76
C1	644	22099	11919	1190	1654	27691	-114	15	19
C2	-129	-12679	-7867	738	-835	268	-1561	-7	-2
C3	-705	-7145	-12073	-1181	-797	-18599	596	-24	-19
C4	-1320	-44484	-13519	-3455	-5042	-59530	-656	-39	-29
C5	1510	42209	21540	2708	5020	50170	1736	55	31
A1-B1	-72	4008	1768	-194	-1425	-7549	31	5	-1
A1-B2	98	5775	5058	724	1540	1267	60	-5	0
A1-B3	-27	-9783	-6826	-530	-114	6282	-90	1	1
A2-B1	72	-4008	-1768	194	1425	7549	-31	-5	1
A2-B2	-98	-5775	-5058	-724	-1540	-1267	-60	5	0
A2-B3	27	9783	6826	530	114	-6282	90	-1	-1
A1-C1	36	1564	4356	84	-131	-5662	155	2	1
A1-C2	87	6764	3522	380	-645	-419	-36	-2	-1
A1-C3	-4	-696	-3188	313	-382	2033	92	0	0
A1-C4	-50	-11971	-9122	-920	-190	6200	-443	-1	1
A1-C5	-69	4339	4432	143	1347	-2153	231	1	-1
A2-C1	-36	-1564	-4356	-84	131	5662	-155	-2	-1
A2-C2	-87	-6764	-3522	-380	645	419	36	2	1
A2-C3	4	696	3188	-313	382	-2033	-92	0	0
A2-C4	50	11971	9122	920	190	-6200	443	1	-1

Tabla 5.1.17. (Continúa)

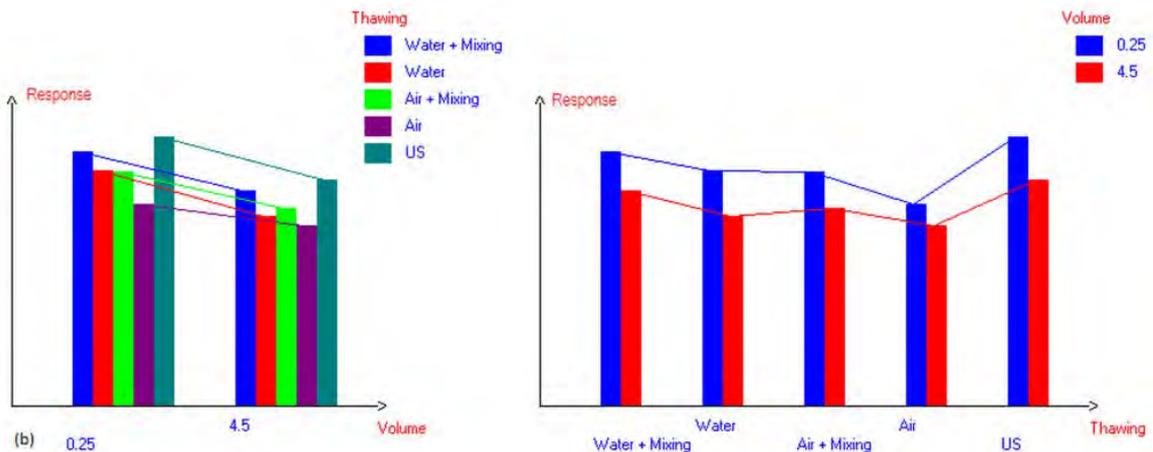
Coeficientes	FA	TG	CE	SM	LPC	PC	PS	Picos (+) detectados	Picos (-) detectados
A2-C5	69	-4339	-4432	-143	-1347	2153	-231	-1	1
B1-C1	464	19326	-8156	-286	-40	2197	-503	4	11
B1-C2	397	1232	-6303	578	-903	-23663	115	-11	-6
B1-C3	68	-17102	3146	-431	-2167	-5653	98	-7	-13
B1-C4	-271	-35776	6429	652	1882	3363	-21	-5	-7
B1-C5	-657	32320	4884	-514	1229	23757	311	20	15
B2-C1	-183	-1834	4645	528	1542	12175	602	0	-2
B2-C2	-559	-247	6523	-529	354	10628	-155	5	-1
B2-C3	-463	11080	3713	583	-233	-7886	265	5	5
B2-C4	-349	17026	15	-1961	-4060	-12866	-398	-4	3
B2-C5	1553	-26024	-14896	1379	2396	-2050	-314	-6	-5
B3-C1	-281	-17492	3511	-242	-1502	-14371	-99	-4	-8
B3-C2	162	-985	-220	-49	549	13036	40	6	7
B3-C3	395	6022	-6858	-152	2400	13539	-363	2	8
B3-C4	620	18751	-6444	1309	2178	9503	419	10	4
B3-C5	-896	-6296	10011	-865	-3625	-21707	3	-14	-10

Los números en negrita denotaron efectos significativos superior al 5%.

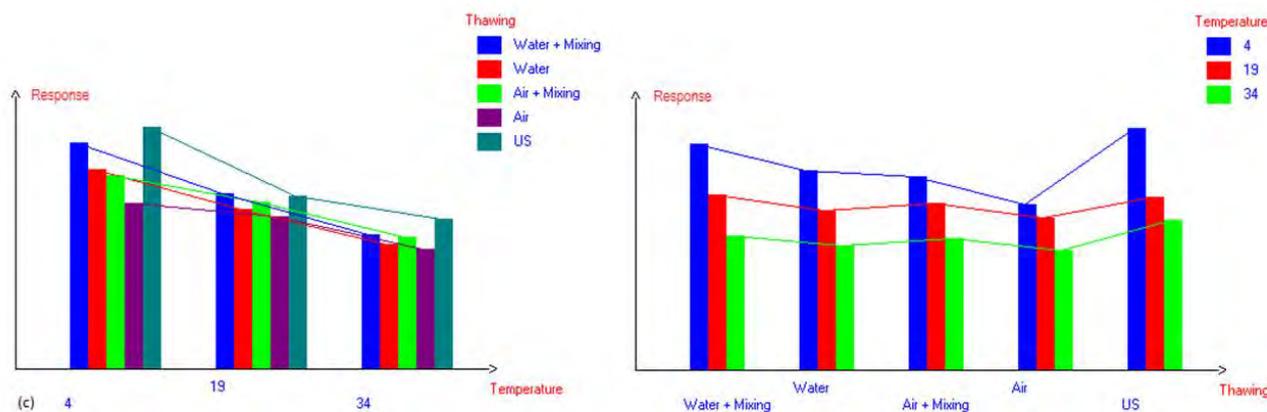
Todas las respuestas estudiadas muestran varios factores significativos y algunos de los factores evaluados también muestran interacciones significativas entre ellos. Por lo tanto, para obtener conclusiones fiables fue necesario estudiar los gráficos de los efectos de las interacciones en profundidad. El análisis de estos gráficos muestra las variaciones que se producen en el área de los picos de los diferentes lípidos evaluados cuando se modifican las condiciones de los factores estudiados. Se debe de destacar que el área de los picos de los lípidos era influenciada de manera similar por los factores analizados, siendo únicamente diferenciados los resultados de una familia, los éster colesterol, que diferían ligeramente del resto de lípidos. Los gráficos de los efectos de las interacciones de los factores son mostrados, en este caso, para la familia de los TGs y son representados en la Figura 5.1.9.



(a) volumen frente a temperatura.



(b) volumen frente a método de descongelación.



(c) temperatura frente a método de descongelación.

Figura 5.1.9. Gráficos de los efectos de las interacciones para la familia de los TGs entre los entre los factores que aparecen descritos en cada apartado.

Para todos los lípidos estudiados, la temperatura es un factor determinante en la cantidad de lípidos obtenidos. Otros estudios han demostrado que cuando los lípidos séricos se someten a cambios de temperatura y repetidos ciclos de congelación/descongelación, las concentraciones lipídicas pueden ser alteradas, sugiriendo que se produce una distribución y modificación de la concentración de los lípidos con la temperatura [18, 25]. En este estudio realizado, se obtuvieron las respuestas más altas para todos los lípidos analizados cuando la temperatura de descongelación era fijada a 4°C (Figuras 5.1.9a y 5.1.9c). Un aumento de la temperatura conduce a una disminución en la respuesta de los lípidos. Este hecho es probablemente debido a que cuando la temperatura aumenta, la degradación de los lípidos puede ser también incrementada.

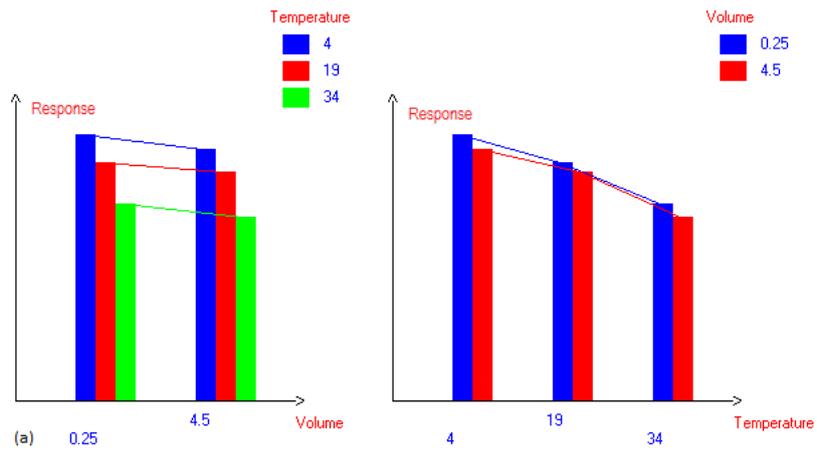
El volumen de la muestra también tuvo un efecto significativo sobre los niveles de lípidos (Figuras 5.1.9a y 5.1.9b). Se obtuvieron señales más altas de los compuestos lipídicos cuando se emplearon volúmenes menores (0.25 mL), pudiéndose relacionar este resultado con el tiempo necesario para realizar el proceso de descongelación. Cuanto mayor sea el volumen utilizado, más extendido en el tiempo será el proceso, dando como resultado un aumento en la degradación de los metabolitos lipídicos. En el caso particular de los éster de colesterol, el volumen de muestra es el factor clave para esta familia, provocando un efecto más significativo que el inducido por la temperatura. Para reducir la variabilidad en los estudios del perfil lipídico, se sugiere, si es posible, fraccionar las muestras de plasma antes del almacenamiento en el menor volumen razonable de alicuotado. Esta sugerencia ya había sido propuesta en una investigación previa, siendo formulada en ese estudio cuando se analizaron lípidos de muestras séricas [18]. Por otra parte, un estudio anterior destacó que los niveles de la mayoría de los metabolitos lipídicos se ven reducidos en muestras de suero y plasma por la acción de los ciclos de congelación/descongelación, procesos que derivan en la mayoría de los casos

del empleo de volúmenes grandes de muestra que es necesario descongelar para analizar una pequeña alícuota de los mismos y son nuevamente congelados [19]. Por lo tanto, si las muestras de plasma se almacenan en un volumen pequeño de alícuota, es posible evitar estos ciclos de congelación/descongelación y, por tanto, se mantendría y preservaría la calidad y composición de las muestras biológicas.

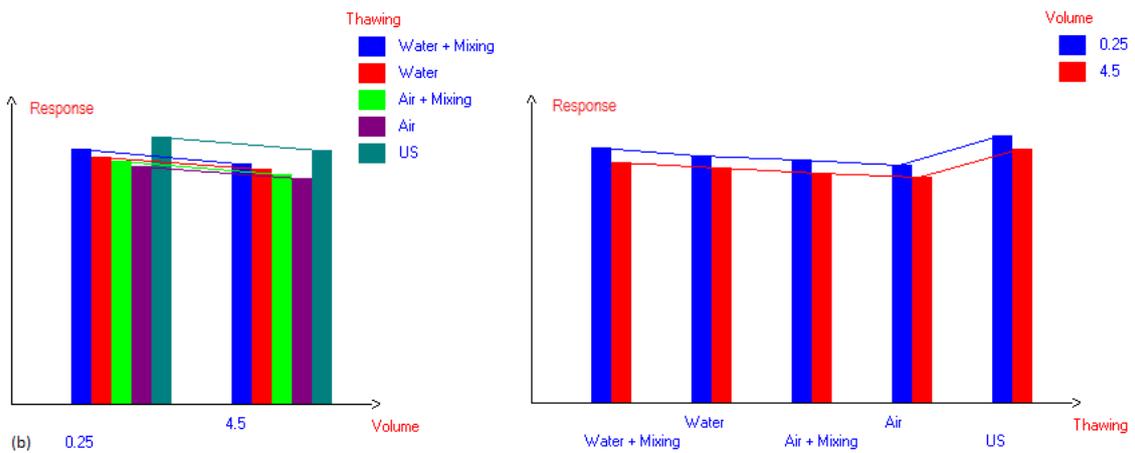
Como era de esperar, el método utilizado para descongelar también afecta directamente sobre los niveles de lípidos [21]. A partir de los resultados obtenidos, se observó que las metodologías de descongelación que incorporaban la técnica de agitación conseguían niveles más altos de lípidos (Figuras 5.1.9b y 5.1.9c). Estos resultados permitieron corroborar que el movimiento constante que introduce la agitación ayuda a aumentar la velocidad de transferencia de calor, traduciéndose este hecho en una mayor rapidez del proceso de descongelación y, a su vez, obteniendo como producto final una muestra que ha sufrido una menor degradación lipídica.

Además, la descongelación realizada con el baño de agua produjo señales más altas que el procedimiento de descongelación a través del contacto con aire, este resultado podría ser debido a que las muestras en el baño de agua se descongelan más rápidamente, reduciendo así la degradación de los lípidos. A su vez, también este hecho puede deberse a que el coeficiente de transferencia de calor del agua es mayor que el del aire, permitiendo llevar a cabo la descongelación en un tiempo menor. Al querer realizar un estudio comparativo completo sobre los diferentes procedimientos empleados en la descongelación de muestras plasmáticas, se analizaron cinco procesos utilizados en esta etapa pre-analítica, logrando obtener las mayores concentraciones de los distintos lípidos con el proceso de descongelación asistida por ultrasonidos. En investigaciones previas a ésta, se había demostrado que la energía ultrasónica es una técnica muy útil para la descongelación rápida de alimentos [28], pero en estudios -ómicos es una técnica que no se usa tanto como podría o debería ser usada [23].

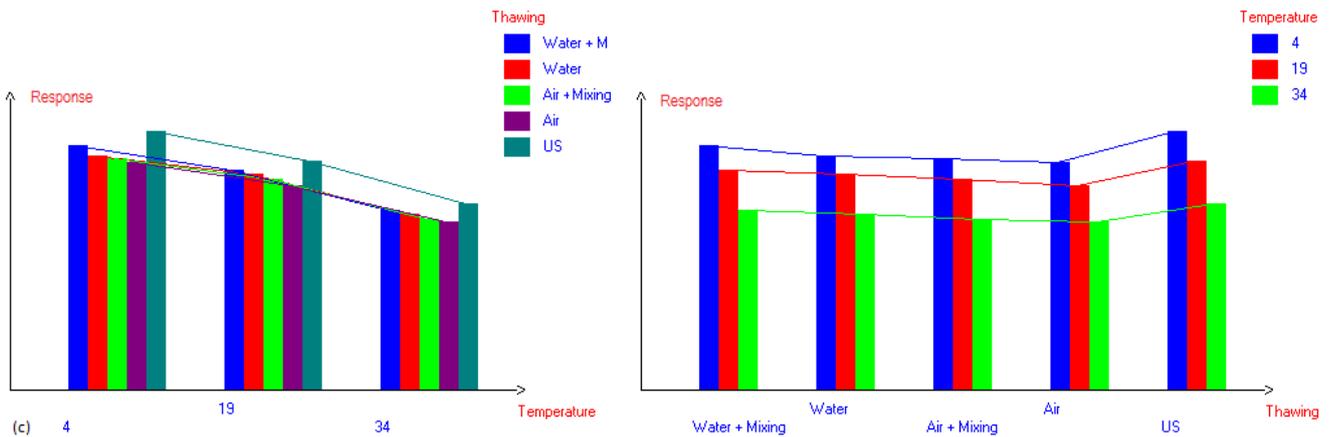
Si se analiza la respuesta correspondiente a la detección de picos, se debe entonces examinar los resultados obtenidos teniendo en cuenta el número de picos registrados, tanto en modo de ionización positivo como negativo (Figuras 5.1.10 y 5.1.11). Estos resultados indicaron que el mayor número de picos fue detectado cuando se llevó a cabo la descongelación a una temperatura de 4°C, con un volumen de 0.25 mL de plasma humano, utilizando como metodología el baño de agua asistido por energía ultrasónica. Estos resultados coincidieron con los obtenidos cuando se evaluaron los niveles de lípidos.



(a) volumen frente a temperatura

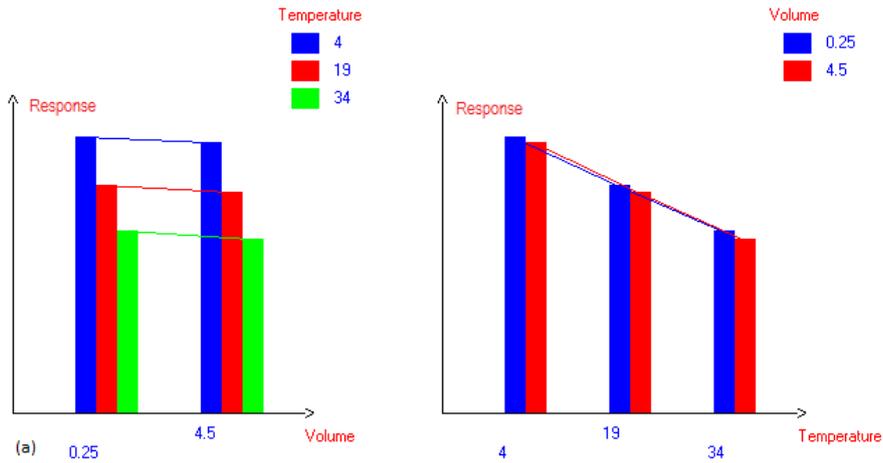


(b) volumen frente a método de descongelación.

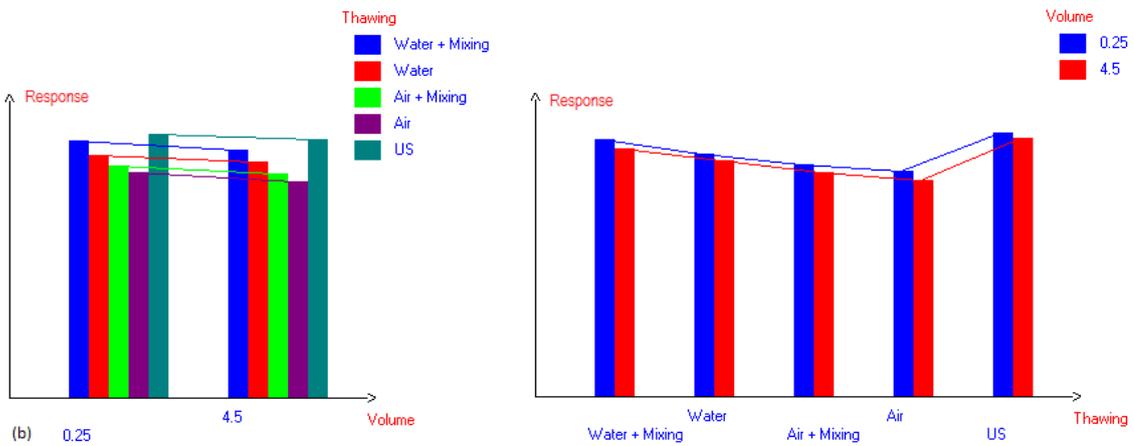


(c) temperatura frente a método de descongelación.

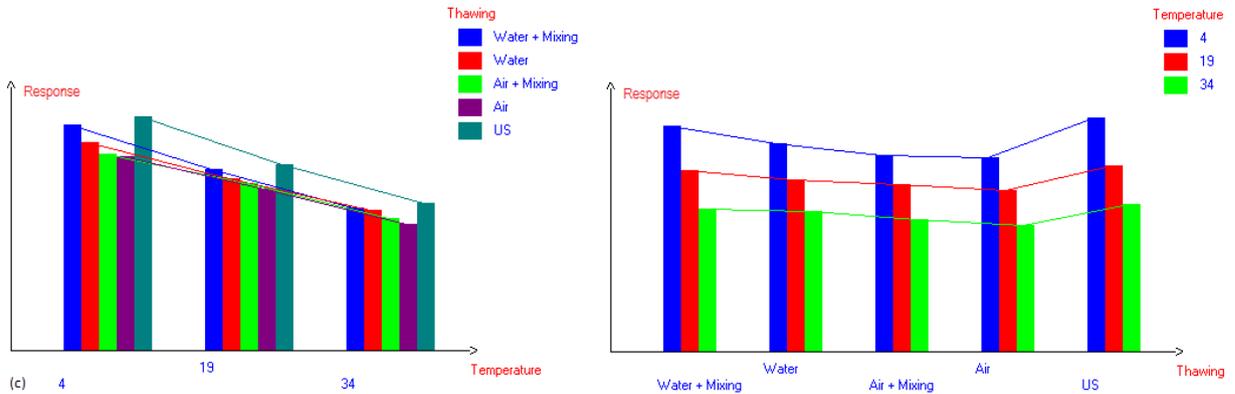
Figura 5.1.10. Gráficos de los efectos de las interacciones para los picos detectados en modo de ionización positivo entre los factores que aparecen descritos en cada apartado.



(a) volumen frente a temperatura.



(b) volumen frente a método de descongelación.



(c) temperatura frente a método de descongelación.

Figura 5.1.11. Gráficos de los efectos de las interacciones para los picos detectados en modo de ionización negativo entre los factores que aparecen descritos en cada apartado.

Al introducir como respuesta la duración del proceso de descongelación, fueron analizados los tiempos requeridos para realizar el proceso por cada una de las metodologías, cronometrando dichos tiempos y dando por finalizado cada uno de los procesos cuando desaparecían los cristales de hielo existentes

en las muestras congeladas. Los tiempos de descongelación más cortos fueron asociados a la siguiente relación de factores: empleo de volúmenes de muestra pequeños (correspondientes a 0.25 mL), temperaturas de descongelación elevadas (34°C) y como metodología de descongelación la combinación del baño de agua con energía ultrasónica. Pero si se tienen en cuenta las condiciones optimizadas para los niveles de lípidos, el proceso de descongelación tuvo una duración de 4,5 min. Este valor fue menor que los valores obtenidos desde la bibliografía consultada, pudiendo deberse esta reducción de tiempo porque en los procesos de descongelación publicados no se utilizó como método de descongelación la aplicación de energía ultrasónica [18, 19, 24, 26, 27].

Teniendo en cuenta todas las respuestas obtenidas con respecto a los factores analizados, se pudieron definir los valores o condiciones óptimas para el proceso de descongelación. Estas condiciones se lograron a través de la configuración de los siguientes valores: para la temperatura 4°C, para el volumen de la muestra de plasma 0.25 mL y para la metodología empleada el baño de agua asistida por energía ultrasónica.

Para comprender mejor las diferencias que se obtuvieron con el análisis comparativo de los procesos, las Figuras 5.1.12a y 5.1.12b muestran los cromatogramas de iones totales (TIC) procedentes de los extractos lipídicos para cada método de descongelación (aire con agitación orbital, baño de agua con agitación orbital y baño de agua asistido con energía ultrasónica), empleando un volumen de 0.25 mL de plasma a una temperatura de 4°C obtenidos estos espectros tanto en modo positivo como negativo. Adicionalmente, las Figuras 5.1.12c-5.1.12i muestran los cromatogramas de iones extraídos (EIC) obtenidos para cada uno de los métodos de descongelación. Como se puede observar, la descongelación asistida por la técnica de ultrasonidos proporcionó las respuestas más altas para los lípidos evaluados.

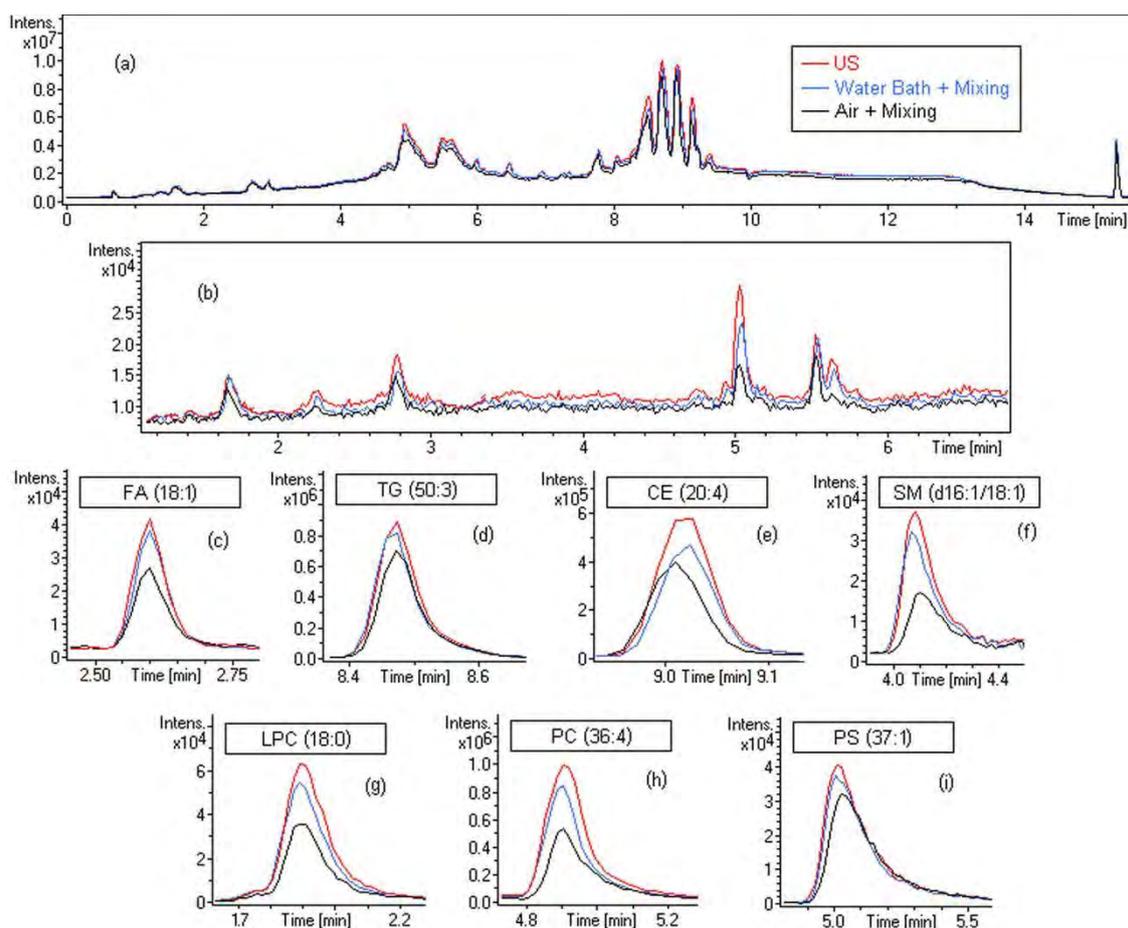


Figura 5.1.12. Estudio comparativo de los cromatogramas de iones totales para los extractos lipídicos de plasma obtenidos en modos de ionización positivo (a) y negativo (b); y cromatogramas de iones extraídos de lípidos característicos para cada familias (c) FA(18:1), (d) TG(50:3), (e) CE(20:4), (f) SM(d16:1/18:1), (g) LPC(18:0), (h) PC(36:4) y (i) PS(37:1) por cada uno de los métodos de descongelación evaluados a partir de un volumen de 0,25 mL de muestras de plasma a una temperatura de 4°C.

5.1.2.5. Comparación entre los distintos procesos de descongelación: Compuestos discriminantes de la descongelación por agua, aire y energía ultrasónica

Para profundizar en el estudio comparativo de los métodos de descongelación con el fin de obtener un exhaustivo perfil lipídico, se compararon las tres metodologías (descongelación con agua, descongelación al aire y descongelación basada en la aplicación de energía por ultrasonidos) en las condiciones previamente optimizadas (a una temperatura de 4°C, un volumen de muestra plasmática de 0.25 mL, así como la incorporación del proceso de agitación tanto a la metodología de agua como a la de aire) para detectar y determinar los lípidos característicos y significativos de cada uno de los diferentes procedimientos de descongelación evaluados.

Las Tablas 5.1.18-5.1.29 proporcionan una serie de listas formadas por los lípidos característicos de cada método de descongelación (tanto en modo de ionización positivo como negativo). En particular, las Tablas 5.1.18-5.1.21

incluyen los lípidos que se identificaron únicamente con el método propuesto por este equipo de investigación aplicando energía ultrasónica, al no encontrarse en las otras dos metodologías de descongelación. En las Tablas 5.1.22-5.1.25 se muestran los lípidos que se identificaron como significativos para la descongelación de baño de agua y de aire al compararlos con la metodología ultrasónica. Finalmente, las Tablas 5.1.26-5.1.29 incluyen las diferencias lipídicas encontradas entre los métodos de descongelación de agua y aire.

Tabla 5.1.18. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Ultrasonidos que no han sido detectados con el método de descongelación de Baño de agua con agitación (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	754.6475	DG(46:5)	C ₄₉ H ₈₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		750.6162	DG(46:7)	C ₄₉ H ₈₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	874.7989	TG(53:1)	C ₅₆ H ₁₀₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		930.7676	TG(58:8)	C ₆₁ H ₁₀₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PA	658.4937	PA(O-34:2)	C ₃₇ H ₇₁ O ₇ P	[M+H] ⁺
		724.5043	PA(38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+H] ⁺
		810.6139	PA(44:3)	C ₄₇ H ₈₇ O ₈ P	[M+H] ⁺
	PC	741.5309	PC(33:3)	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		765.5309	PC(35:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		793.5622	PC(37:5)	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		803.5465	PC(38:7)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		955.7969	PC(48:1)	C ₅₆ H ₁₁₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PE	697.5046	PE(P-34:3)	C ₃₉ H ₇₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		811.6455	PE(P-42:2)	C ₄₇ H ₉₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	PS	819.5414	PS(P-40:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₉ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.19. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Ultrasonidos que no han sido detectados con el método de descongelación de Baño de agua con agitación (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	668.5380	DG(40:6)	C ₄₃ H ₇₂ O ₅	[M-H] ⁻
Glicerofosfolípidos	PE	747.5203	PE(P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M-H] ⁻
	PC	825.6611	PC(P-40:2)	C ₄₈ H ₉₂ NO ₇ P	[M-H] ⁻
		857.5935	PC(42:8)	C ₅₀ H ₈₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.20. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Ultrasonidos que no han sido detectados con el método de descongelación de Contacto con aire con agitación (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	590.4910	DG(34:3)	C ₃₇ H ₆₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		754.6475	DG(46:5)	C ₄₉ H ₈₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		750.6162	DG(46:7)	C ₄₉ H ₈₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	832.6581	TG(51:8)	C ₅₄ H ₈₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		874.7989	TG(53:1)	C ₅₆ H ₁₀₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		930.7676	TG(58:8)	C ₆₁ H ₁₀₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		948.7207	TG(60:13)	C ₆₃ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		956.7833	TG(60:9)	C ₆₃ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PA	658.4937	PA(O-34:2)	C ₃₇ H ₇₁ O ₇ P	[M+H] ⁺
		724.5043	PA(38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+H] ⁺
	PC	705.5309	PC(30:0)	C ₃₈ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		741.5309	PC(33:3)	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.20. (Continúa)

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PC	765.5309	PC(35:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		793.5622	PC(37:5)	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		799.6455	PC(P-38:1)	C ₄₆ H ₉₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		827.6768	PC(P-40:1)	C ₄₈ H ₉₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		955.7969	PC(48:1)	C ₅₆ H ₁₁₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PE	697.5046	PE(P-34:3)	C ₃₉ H ₇₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		811.6455	PE(P-42:2)	C ₄₇ H ₉₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	PS	819.5414	PS(P-40:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₉ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.21. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Ultrasonidos que no han sido detectados con el método de descongelación de Contacto con aire con agitación (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	668.5380	DG(40:6)	C ₄₃ H ₇₂ O ₅	[M-H] ⁻
Glicerofosfolípidos	PE	747.5203	PE(P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M-H] ⁻
	PC	825.6611	PC(P-40:2)	C ₄₈ H ₉₂ NO ₇ P	[M-H] ⁻
		857.5935	PC(42:8)	C ₅₀ H ₈₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.22. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Baño de agua con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Ultrasonidos (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	722.5849	DG(44:7)	C ₄₇ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	SM	760.6458	SM(d18:0/20:0)	C ₄₃ H ₈₉ N ₂ O ₆ P	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PE	687.5203	PE(P-33:1)	C ₃₈ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		703.5516	PE(P-34:0)	C ₃₉ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		723.4839	PE(35:5)	C ₄₀ H ₇₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		741.5308	PE(36:3)	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		743.5465	PE(36:2)	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		793.5985	PE(P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		797.5935	PE(40:3)	C ₄₅ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		799.6091	PE(40:2)	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.23. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Baño de agua con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Ultrasonidos (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PE	745.5621	PE(36:1)	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.24. Lípidos identificados con el método de descongelación Contacto con aire con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Ultrasonidos (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	578.4910	DG(33:2)	C ₃₆ H ₆₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		688.5067	DG(42:10)	C ₄₅ H ₆₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		706.6475	DG(42:1)	C ₄₅ H ₈₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	SM	814.6928	SM(d18:1/24:0)	C ₄₇ H ₉₅ N ₂ O ₆ P	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PC	895.7030	PC(44:3)	C ₅₂ H ₉₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		687.5203	PE(P-33:1)	C ₃₈ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
	703.5516	PE(P-34:0)	C ₃₉ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
	723.4839	PE(35:5)	C ₄₀ H ₇₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
	743.5465	PE(36:2)	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
	783.6142	PE(P-40:2)	C ₄₅ H ₈₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
	793.5985	PE(P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	
	825.6248	PE(42:3)	C ₄₇ H ₈₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	
	883.7030	PE(46:2)	C ₅₁ H ₉₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	

Tabla 5.1.25. Lípidos identificados con el método de descongelación Contacto con aire con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Ultrasonidos (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Esfingolípidos	GlcCer	837.7057	GlcCer(d18:1/26:1)	C ₅₀ H ₉₅ NO ₈	[M-H] ⁻
Glicerofosfolípidos	PC	775.5152	PC(36:7)	C ₄₄ H ₇₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻
		745.5621	PE(36:1)	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	[M-H] ⁻
	PE	761.5935	PE(37:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.25. (Continúa)

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PG	774.5410	PG(36:2)	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		776.5567	PG(36:1)	C ₄₂ H ₈₁ O ₁₀ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.26. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Baño de agua con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Contacto con aire con agitación (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	590.4910	DG(34:3)	C ₃₇ H ₆₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
		722.5849	DG(44:7)	C ₄₇ H ₇₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	832.6581	TG(51:8)	C ₅₄ H ₈₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		886.7050	TG(55:9)	C ₅₈ H ₉₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		924.8146	TG(57:4)	C ₆₀ H ₁₀₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
		956.7833	TG(60:9)	C ₆₃ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
960.8146	TG(60:7)	C ₆₃ H ₁₀₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺		
Esfingolípidos	SM	760.6458	SM(d18:0/20:0)	C ₄₃ H ₈₉ N ₂ O ₆ P	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PC	827.6768	PC(P-40:1)	C ₄₈ H ₉₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺
		897.7187	PC(44:2)	C ₅₂ H ₁₀₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PE	741.5308	PE(36:3)	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		797.5935	PE(40:3)	C ₄₅ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		PG	820.5254	PG(40:7)	C ₄₆ H ₇₇ O ₁₀ P

Tabla 5.1.27. Lípidos identificados con el método de descongelación asistido por Baño de agua con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Contacto con aire con agitación (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerofosfolípidos	PC	775.5152	PC(36:7)	C ₄₄ H ₇₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻

Tabla 5.1.28. Lípidos identificados con el método de descongelación Contacto con aire con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Baño de agua con agitación (en modo de ionización positivo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Glicerolípidos	DG	562.4597	DG(32:3)	C ₃₅ H ₆₂ O ₅	[M+H] ⁺
		706.6475	DG(42:1)	C ₄₅ H ₈₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺
	TG	928.7520	TG(58:9)	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺
Esfingolípidos	SM	814.6928	SM(d18:1/24:0)	C ₄₇ H ₉₅ N ₂ O ₆ P	[M+NH ₄] ⁺
Glicerofosfolípidos	PC	803.5465	PC(38:7)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
	PE	602.4424	PE-Cer(d14:2/16:0)	C ₃₂ H ₆₃ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺
		825.6248	PE(42:3)	C ₄₇ H ₈₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺
		883.7030	PE(46:2)	C ₅₁ H ₉₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺

Tabla 5.1.29. Lípidos identificados con el método de descongelación Contacto con aire con agitación que no han sido detectados con el método de descongelación de Baño de agua con agitación (en modo de ionización negativo).

Categoría	Sub-Categoría	Masa (Da)	Nombre	Fórmula	Ionización
Esfingolípidos	GlcCer	837.7057	GlcCer(d18:1/26:1)	C ₅₀ H ₉₅ NO ₈	[M-H] ⁻
Glicerofosfolípidos	PC	801.5309	PC(38:8)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₈ P	[M-H] ⁻
	PE	761.5935	PE(37:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻
	PG	774.5410	PG(36:2)	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻
		776.5567	PG(36:1)	C ₄₂ H ₈₁ O ₁₀ P	[M-H] ⁻

Con el objetivo de facilitar la visualización de los resultados obtenidos se utilizaron diagramas de Venn (Figura 5.1.13). Los diagramas de Venn permiten mostrar los resultados de forma clara y gráfica.

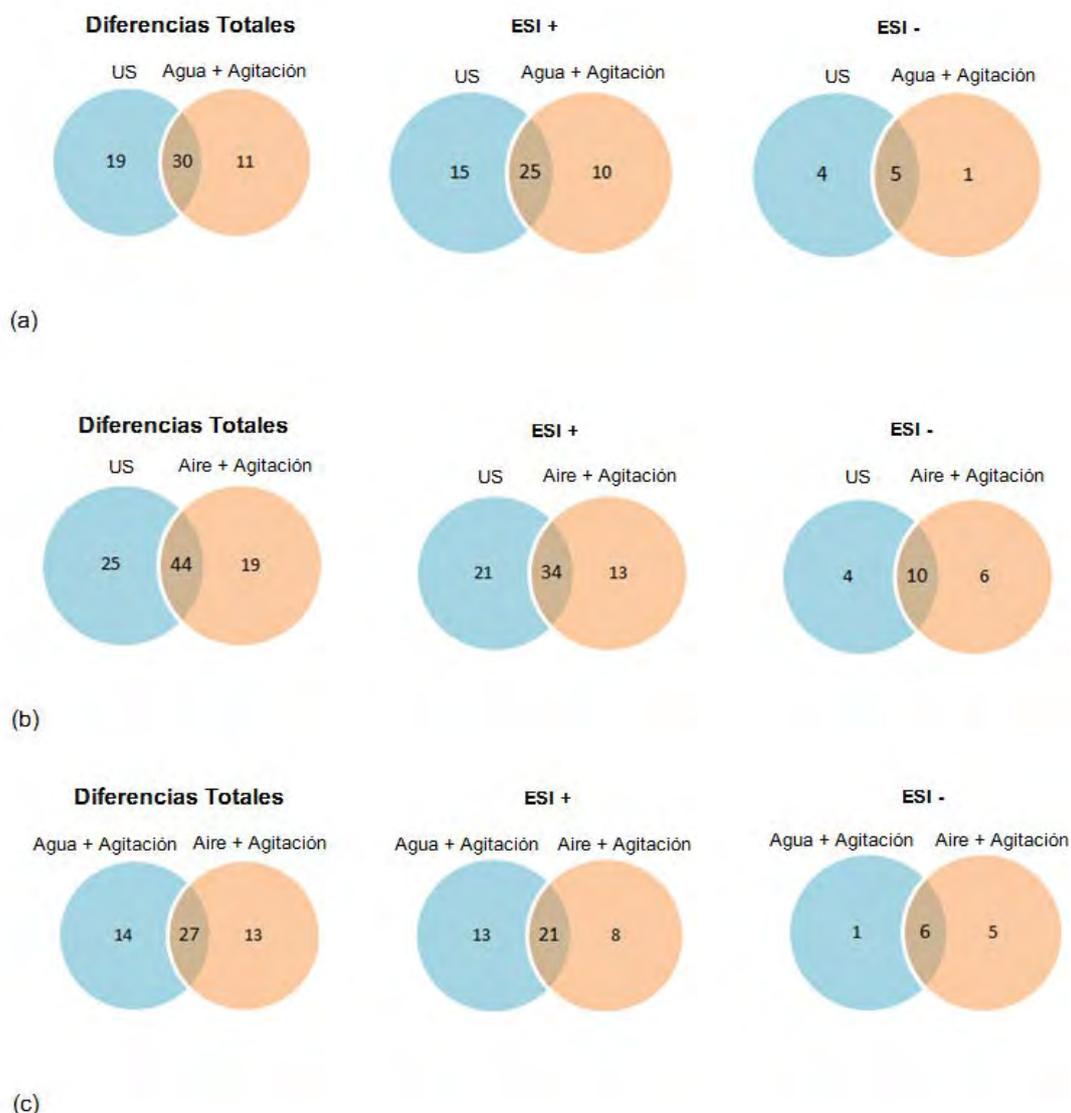


Figura 5.1.13. Diagramas Venn que muestran las diferencias encontradas entre los diferentes métodos de descongelación evaluados: (a) Ultrasonidos frente a Baño de agua con agitación (b) Ultrasonidos frente a Contacto con aire con agitación y (c) Baño de agua con agitación frente a Contacto con aire con agitación (a 4°C y con un volumen de plasma de 0.25 mL).

Si se examina la Figura 5.1.13a se puede observar que el método de descongelación asistido por energía ultrasónica proporcionó 19 lípidos significativos (15 lípidos detectados en modo de ionización positivo y 4 lípidos en modo negativo) que no se localizaron en las muestras descongeladas con el baño de agua. En cambio, el método de descongelación por medio de agua proporcionó 11 lípidos únicos (10 y 1 en modo positivo y negativo, respectivamente), los cuales no se encontraron cuando se empleó la descongelación mediante ultrasonidos. Tras el análisis comparativo de estas

dos metodologías de descongelación se pudo obtener un total de 30 diferencias lipídicas (19 + 11), percibiéndose este valor a través de la superposición de las áreas de los círculos que representan cada metodología.

Como se puede observar por la Figura 5.1.13, el mayor número de diferencias (44 lípidos) se encontró cuando se comparó el método de descongelación por ultrasonidos con el método de descongelación por aire y agitación orbital (Figura 5.1.13b). Estas diferencias lipídicas probablemente podrían deberse al hecho de que el coeficiente de transferencia de calor del agua es mayor que el del aire, teniendo lugar por esta propiedad un proceso de descongelación más lento cuando se emplea la metodología asistida por aire, permitiendo aumentar la probabilidad para que se produzca la degradación de los lípidos. Además, entre los métodos de descongelación evaluados, la descongelación por ultrasonidos fue la metodología más rápida, logrando la preservación del perfil lipídico de muestras plasmáticas y proporcionando un mayor número de lípidos en comparación con los otros métodos (Tablas 5.1.18-5.1.29).

Por otra parte, la mayoría de los lípidos denominados significativos para las metodologías de aire y agua asistidas por agitación orbital se identificaron como lípidos que derivaban de diferentes procesos de degradación o debido a reacciones radicalarias, siendo empleados en estos procesos como partida los lípidos que habían sido significativos en la metodología de descongelación asistida por energía ultrasónica.

Por esta razón, los lípidos más abundantes y significativos de los métodos de descongelación por agua y aire, los diglicéridos (DG) y las fosfatidiletanolaminas (PE), podrían originarse por los procesos de degradación de las familias lipídicas TG y PC, siendo detectados y característicos estos compuestos por la descongelación asistida mediante ultrasonidos. Además, se tiene que tener presente que las PE determinadas en los métodos de descongelación por agua y aire también podrían originarse mediante reacciones radicales de otras PE presentes y características de la metodología de descongelación por ultrasonidos. Como se ha demostrado en este estudio analizando los resultados obtenidos, entre los tres métodos de descongelación evaluados se debe de considerar a la metodología de descongelación asistida por ultrasonidos como la estrategia que permitió lograr una mayor preservación del perfil lipídico de muestras plasmáticas.

Ante la información aportada en esta investigación, se puede observar que para obtener resultados fiables y reducir el riesgo de detectar falsos biomarcadores en las investigaciones lipídicas es importante realizar adecuadamente la descongelación de las muestras de plasma, ya que se han obtenido notables diferencias en el perfil lipídico al variar los valores de los

factores que están involucrados y afectan significativamente en el proceso de descongelación.

El nuevo protocolo mostrado para la descongelación basado en la aplicación de energía ultrasónica resulta ser un método económico, rápido y eficiente para descongelar muestras de plasma, presentando la característica primordial de conservar los perfiles lipídicos. A través del estudio de los factores significativos del proceso de descongelación se ha podido analizar que para reducir la variabilidad existente en los estudios del perfilado lipídico, se debe, si es posible, fraccionar las muestras de plasma en los volúmenes menores posibles de alicuotado antes del almacenamiento. A su vez, cuando se produzca la descongelación se debería de tener un control sobre la temperatura del proceso, ya que como se ha observado es un factor relevante en el perfilado de lípidos.

Entre los resultados presentados en este trabajo se debe destacar que las mejores condiciones de descongelación se obtienen cuando se emplea el método de descongelación basado en energía ultrasónica, a temperatura de 4°C y con un volumen de muestra de 0.25 mL. Estas condiciones experimentales permiten la determinación robusta de las múltiples clases de lípidos inherentes en las muestras de plasma, minimizando cualquier variabilidad que pudiera ser introducida por el proceso de descongelación. Por lo tanto, los investigadores en este campo tendrán que ser conscientes de la importancia que tienen las etapas pre-analíticas sobre los datos que se quieren obtener con el fin de mejorar la calidad de los perfiles lipídicos de las muestras plasmáticas.

5.1.2.6. Conclusiones

En este estudio, se obtuvo información relevante sobre el procedimiento de descongelación de muestras de plasma con el fin de garantizar la calidad del descubrimiento de biomarcadores en la investigación de lípidos. A raíz de la aplicación de la metodología de diseño de experimentos, se pudo examinar en profundidad las condiciones de descongelación que influyen en la calidad de la composición lipídica y establecer un protocolo bien definido de este proceso para la eliminación o minimización de la variabilidad de los datos obtenidos tras el análisis lipídico. Los resultados expuestos en este estudio muestran como todos los factores experimentales involucrados en la etapa de descongelación son de gran relevancia, destacando la importancia que tiene este proceso en cualquier estudio lipídico. Además, el enfoque del diseño de experimentos permitió evaluar exhaustivamente las interacciones de los factores significativos y mostrar cuáles son las combinaciones de factores (temperatura, volumen y método de descongelación) que proporcionan las máximas respuestas con respecto a las concentraciones de los lípidos evaluados.

Como se ha analizado y verificado en este estudio, la temperatura es un factor determinante en el proceso de descongelación y, por esta razón, es necesario llevar un control de la misma para obtener un adecuado perfil lipídico. Pero no sólo tuvo un efecto relevante este factor, ya que la relación de volúmenes también tuvo un efecto significativo en la concentración de lípidos.

Las condiciones óptimas para llevar a cabo la descongelación se definieron con los siguientes parámetros: temperatura de 4°C, volumen de plasma 0,25 mL y descongelación basada en la utilización de ultrasonidos como mejor metodología. Este estudio, además, demostró que la aplicación de energía ultrasónica en la descongelación disminuye los tiempos requeridos en la misma.

Por lo tanto, la principal ventaja del novedoso procedimiento propuesto para la descongelación basada en ultrasonidos es que puede y permite determinar las múltiples clases de lípidos presentes en muestras de plasma, mostrando unos resultados con alta eficiencia y un mínimo sesgo, un aumento en el número de picos identificados, una disminución en el tiempo requerido para este proceso y un menor coste. Por último, tan solo cabe destacar que este protocolo se podría aplicar fácilmente en los laboratorios clínicos que se dedican a realizar estudios e investigaciones lipídicas.

5.2. Análisis del perfil metabólico y lipidómico de pacientes con VIH y co-infectados con VHC mediante espectroscopia óptica y cromatografía líquida

En los siguientes apartados se va a mostrar la gran relevancia que tiene el empleo de plataformas analíticas combinadas con técnicas quimiométricas en la discriminación de pacientes infectados con virus que actualmente tienen una gran repercusión a nivel mundial. Estas investigaciones se han llevado a cabo para discriminar a estos pacientes a través tanto de cromatografía líquida y espectroscopia. Además, se propondrá la realización de una clasificación con dos enfoques para discriminar a pacientes con la misma enfermedad, pero con estadios diferentes de la misma.

5.2.1. Discriminación de pacientes con diferentes evoluciones serológicas del VIH y de la co-infección con VHC utilizando huellas dactilares metabólicas obtenidas mediante FT-IR

5.2.1.1. Introducción

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus que progresivamente induce a la destrucción de ciertas células sanguíneas responsables del sistema inmunológico. Los pacientes con VIH están expuestos a ataques de enfermedades oportunistas como el VHC debido al debilitado estado de su sistema inmunológico [30]. Esta combinación de enfermedades denominada co-infección es bastante común, siendo desarrolladas ambas patologías simultáneamente por el 25-40 por ciento de los pacientes con VIH de Estados Unidos y Europa [31]. La infección por VIH comúnmente induce anormalidades metabólicas, incluyendo dislipidemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina y diabetes. Estas anormalidades pueden ser descritas a través de las interacciones complejas y dinámicas que se producen por la terapia antirretroviral, los factores de interacción entre las células huésped con el agente patógeno y la propia infección generada por el VIH [32-34].

Las pruebas diagnósticas convencionales para la detección del VIH se basan en una estrategia secuencial de pruebas en la que los análisis de detección y confirmación deben de realizarse repetidamente y en tándem para proporcionar resultados precisos y fiables. Los ensayos de detección del VIH se basan en la localización combinada de antígenos del VIH y anticuerpos (cultivos virales y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa - PCR) o en la detección indirecta de anticuerpos específicos contra el VIH mediante técnicas serológicas (ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas - ELISA y pruebas rápidas).

En cuanto a las pruebas de confirmación diagnóstica de pacientes positivos en el VIH, el ensayo de Western blot (WB) es el más utilizado para la detección de anticuerpos contra el VIH. Además, después del diagnóstico positivo del

VIH, los pacientes deben ser monitorizados de acuerdo con un esquema de seguimiento multimodal, que incluya evaluación clínica, evaluación de la carga viral (mediante citometría de flujo o métodos basados en ELISA) y el conteo de linfocitos CD4 y CD8 (cúmulo de diferenciación 8). La mayoría de estas pruebas de detección, confirmación y seguimiento, a pesar de tener una precisión aceptable en términos de sensibilidad y especificidad, comparten importantes desventajas, ya que son pruebas caracterizadas por costar altos precios, necesitar tiempos largos para su ejecución y precisar de gran cantidad de mano de obra. Además, la frecuencia relativa en la que se obtienen resultados indeterminados “resultados que no son ni positivos ni negativos” (especialmente en el caso del ensayo de WB) puede retardar aún más el diagnóstico y aumentar los costes.

Por lo tanto, la necesidad de herramientas analíticas rápidas, fiables y económicamente sostenibles sigue siendo un desafío para realizar el diagnóstico y la vigilancia del VIH.

En este contexto, la metabolómica ha sido ampliamente aplicada para desarrollar nuevas y completas herramientas de diagnóstico en la investigación biomédica. Esta ciencia estudia los procesos químicos mediante el uso de un análisis exhaustivo y cualitativo/cuantitativo del metaboloma (conjunto de pequeñas moléculas denominadas metabolitos) en un determinado sistema biológico (célula, tejido, órgano, biofluido u organismo).

Los enfoques metabolómicos son particularmente útiles en el diagnóstico de enfermedades que llevan asociadas trastornos de metabolitos (como es el caso de la infección por VIH), permitiendo llevar a cabo análisis de alto rendimiento [35, 36]. Varias estrategias analíticas se pueden aplicar para abordar estudios metabolómicos, dependiendo del propósito que se quiere obtener. Por ello, se pueden emplear enfoques abiertos o no dirigidos, utilizados para medir y comparar tantos metabolitos como sea posible, o por otra parte enfoques dirigidos, cuya finalidad es examinar un conjunto definido o determinado de metabolitos. Con estos enfoques se puede realizar un diagnóstico y una monitorización eficaz de las enfermedades que conllevan un trastorno metabólico. Por esta razón, numerosas investigaciones biomédicas se han realizado empleando diversas plataformas analíticas con el fin de obtener un perfil metabólico.

En este contexto, las técnicas espectroscópicas vibracionales, y en particular la espectroscopia FT-IR, son técnicas que han sido implementadas y utilizadas ampliamente para obtener huellas químicas de diferentes matrices biológicas, gracias a las ventajas analíticas que presentan y a los avances que se han realizado en instrumentación como en quimiometría [36, 37]. El espectro FT-IR de una muestra biológica está compuesto por características bandas de absorción que provienen de las vibraciones moleculares de biomoléculas

(lípidos, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos) que forman parte de la muestra, permitiendo realizar el análisis simultáneo de múltiples biomoléculas en una sola medición y generando una única huella bioquímica [38]. Por lo tanto, el espectro de la huella dactilar de una muestra biológica registrado por FT-IR es el reflejo de su condición de salud subyacente. Este hecho hace que la aplicación de esta técnica se haya visto muy adecuada y potenciada para la realización de biodiagnóstico médico.

Otras características que hacen apropiada a la técnica FT-IR para su uso en el biodiagnóstico radican en que es una técnica no invasiva y no destructiva, rápida (no requiere preparación o es mínima), sensible y relativamente barata (en comparación con las técnicas utilizadas comúnmente en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad del VIH: técnicas de citometría de flujo, PCR o ELISA). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la gran cantidad de señales vibracionales que forman un espectro IR requieren del uso de la quimiometría para convertir esos datos recogidos en información valiosa. De hecho, los métodos de análisis multivariable (entre los que se destaca el reconocimiento de patrones, la selección de variables y las técnicas de clasificación) ya han sido ampliamente utilizados en la investigación y el diagnóstico de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, los trastornos vasculares, la artritis y la diabetes [38-40]. Del mismo modo, la espectroscopia FT-IR ya ha sido empleada con éxito para investigar las variaciones espectrales vinculadas a distintos componentes moleculares, así como detectar estados de enfermedad de diferentes tejidos y células [38, 39], e incluso, unos pocos estudios se han realizado sobre la discriminación y segregación de pacientes infectados por VIH frente a sujetos control aplicando espectroscopia FT-IR [34, 41-43].

Teniendo en cuenta toda esta información, el presente estudio se centra en evaluar cómo el perfil metabólico plasmático humano puede ser alterado en personas con diferentes estadios de la enfermedad inducida por el VIH y cómo estos cambios metabólicos, registrados en las señales de espectroscopia infrarroja, pueden asociarse a diferentes condiciones patológicas. Un estudio bibliográfico realizado sobre este asunto ha confirmado que ésta es la primera vez que la espectroscopia FT-IR, en combinación con las herramientas quimiométricas, se ha utilizado para discriminar entre diferentes clases de pacientes infectados por el VIH según la evolución de la enfermedad, centrandolo en VIH, SIDA y co-infección con VHC. Específicamente, los grupos de cohorte analizados fueron: i) pacientes infectados asintóticamente con el VIH (VIH); ii) pacientes infectados por el VIH que habían desarrollado el SIDA (SIDA); iii) pacientes infectados asintóticamente por el VIH que padecían la co-infección generada por el virus de la Hepatitis C (VIH/VHC); iv) pacientes con SIDA y co-infectados con Hepatitis C (SIDA/VHC); y v) sujetos control (control).

Para llevar a cabo la investigación, se utilizó un enfoque metabólico no dirigido (combinando la aplicación FT-IR con el análisis de datos multivariantes) para revelar las señales y longitudes de onda de los biomarcadores espectroscópicos que son capaces de definir los subgrupos de pacientes con el fin de obtener un diagnóstico clínico y clasificar los diferentes estadios de enfermedad inducidos por el VIH. Este enfoque integrado (basado en señales espectroscópicas/metabólicas) trata de proporcionar respuestas holísticas sobre el VIH/SIDA para abordar un problema de salud mundial muy relevante en nuestros días. Por esta razón, se hizo hincapié en investigar la existencia de diferentes patrones espectroscópicos entre la propia enfermedad del VIH y la enfermedad de la Hepatitis C, relacionándolos con los cambios metabólicos subyacentes. Y, por lo tanto, correlacionando estos cambios con la etapa de la enfermedad correspondiente, evitando la identificación de biomarcadores individuales que fuesen capaces de realizar un diagnóstico limitado e incapaces de captar la complejidad de las alteraciones inmunológicas/metabólicas asociadas al VIH.

El enfoque para realizar el análisis exhaustivo de los pacientes se planteó a través de una clasificación en dos etapas, consiguiendo desarrollar dos modelos de clasificación que trabajaban en tándem, por medio de la selección de variables discriminantes gracias al empleo del LDA. El primer modelo permitió lograr una discriminación precisa entre los pacientes infectados asintómicamente con VIH. Mientras que el segundo modelo proporcionaba una diferenciación adicional entre los pacientes que formaban los diversos subgrupos de estados de enfermedad avanzada.

Una de las principales ventajas que presentó esta investigación residió en la aplicación de métodos de selección de variables (STEPWISE y SELECT) para elegir las longitudes de onda eficaces, que luego fueron sometidas al LDA para extraer un número mínimo (máxima parsimonia) de bandas espectrales significativas a partir de los espectros de plasma FT-IR, con las que se desarrollaron los modelos de clasificación. El objetivo final de estas clasificaciones altamente confiables es utilizarlas como herramientas de detección y/o diagnóstico simples y sensibles para diagnosticar a nuevos pacientes, usando las señales metabólicas seleccionadas del IR.

Debe aclararse que la ambición de este estudio no era proporcionar soluciones definitivas e inmutables para el diagnóstico y estadificación de la enfermedad, sino proponer una metodología eficaz basada en IR capaz de llevar a cabo esta tarea y demostrar su fiabilidad. Los prometedores resultados presentados pueden servir para apoyar la viabilidad de reemplazar los métodos costosos de tiempo y de consumo actualmente utilizados como práctica clínica por señales de biomarcadores basadas en perfiles metabólicos espectroscópicos. Resultados que deben de alentar a otros investigadores a

considerar enfoques similares en el futuro para ampliar el campo de aplicación con un rango y una gama más amplia de muestras biológicas.

5.2.1.2. Desarrollo experimental

En lo referente a reactivos, preparación de la muestra, condiciones experimentales utilizadas en la espectroscopia óptica se remite al Capítulo 4 de la presente tesis doctoral (Desarrollo experimental).

5.2.1.3. Estudio de la población

El presente estudio se centró en el análisis de 72 pacientes cuyas muestras de plasma fueron sometidas a pruebas de diagnóstico de VIH y VHC en el Área de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja. Primeramente a las muestras de plasma de los pacientes se les sometió al análisis de evidencias serológicas de infección por VIH, dando como resultado positivo a 53 pacientes. Una vez fueron clasificados como infectados por VIH se sometió a las muestras de plasma a pruebas de detección de VHC para efectuar la categorización y la división de los pacientes en los distintos grupos de estudio según el grado de enfermedad.

De este modo, un total de 20 pacientes fueron clasificados como pacientes clínicamente asintomáticos por el VIH, 11 pacientes fueron agrupados como pacientes que habían desarrollado SIDA y 9 pacientes fueron definidos como pacientes clínicamente asintomáticos tanto en VIH como en VHC (VIH/VHC). Al realizar estas dos pruebas se pudo clasificar otro grupo formado por 13 pacientes, en los cuáles había evolucionado su enfermedad a la etapa avanzada de SIDA y presentaban co-infección con VHC (SIDA/VHC); por último, se consideraron 19 sujetos denominados sujetos control.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital San Pedro de La Rioja y, a su vez, se informó a todos los pacientes involucrados en el estudio y se obtuvo el consentimiento de todos ellos.

5.2.1.4. Análisis de datos

Los datos espectrales de FT-IR se analizaron usando técnicas multivariantes con el fin de desarrollar y construir clasificaciones exactas y eficientes, a través de la minimización de las señales que no aportan información relevante para el análisis y son contenidas en los espectros. Para estas clasificaciones se extrajeron subconjuntos de marcadores espectroscópicos que presentaban significancia en la discriminación de los pacientes.

Para abordar el tratamiento de los datos espectroscópicos, antes de comenzar el análisis de las señales, se aplicó a todos los espectros una corrección de la línea base modelada por una función polinomial de segundo

orden utilizando el algoritmo de mínimos cuadrados ponderados (WLS) disponible en el paquete PLS-Toolbox de Matlab (versión 6.7.1; Eigenvector Research Inc., Washington, USA).

El rango espectral del IR para este estudio fue limitado a dos ventanas espectrales: 1050-1585 y 1700-2956 cm^{-1} . Los rangos de longitudes de onda 300-1049, 1586-1699 y 2957-4000 cm^{-1} fueron eliminados y no se tuvieron en cuenta en los posteriores análisis de los datos, ya que estos intervalos parecían estar afectados por los efectos de saturación causados principalmente por la absorción del agua.

El pretratamiento espectral SNV fue utilizado para minimizar los efectos de dispersión y el ruido de fondo. De esta manera, se mejoró la interpretación de las diferencias inter-muestras, siendo los datos centrados antes de la realización del análisis multivariado.

Como paso preliminar antes de aplicar la estrategia de clasificación secuencial propuesta en este trabajo, se empleó el PCA a los espectros IR con el fin de buscar y reconocer grupos o patrones clínicamente significativos dentro de los datos. La información recogida en este análisis exploratorio de datos sirvió como ayuda para delimitar y definir las categorías usadas más adelante en la clasificación. El análisis de componentes principales al ser un método no supervisado es ampliamente aplicado en el reconocimiento de patrones, a su vez, esta técnica permite reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y explorar y analizar la variabilidad intrínseca de los mismos.

A través de esta técnica se pueden abordar y solucionar algunos problemas comúnmente asociados con los grandes conjuntos de datos multivariados (visualización de los datos con elevada dimensionalidad, multicolinealidad existente entre variables o la presencia de ruido), ya que transforma las variables originales en un conjunto más pequeño de variables llamadas componentes principales (PC), formadas por combinaciones lineales no correlacionadas de las variables originales. Las primeras componentes principales son normalmente capaces de explicar la mayor parte de la varianza de los datos, proporcionando un espacio de baja dimensionalidad que permite visualizar los datos con claridad y realizar un adecuado análisis exploratorio de los mismos [44]. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software quimiométrico The Unscrambler X (versión 10.4, Camo Software, Oslo, Noruega).

Un parámetro decisivo que debe establecerse antes del desarrollo de cualquier modelo de clasificación es el número de categorías o clases que se van definir para agrupar las muestras de estudio y los requisitos particulares que una muestra debe cumplir para ser asignada a una determinada clase. En este estudio, la estrategia de clasificación que se implementó se basó en una secuencia de dos modelos de clasificación consecutivos, en los que se

consideraron diferentes categorías, permitiendo esta estrategia pasar de un enfoque genérico de clasificación de enfermedades globales a una discriminación específica de cada enfermedad avanzada. Por este motivo, en una etapa inicial de clasificación global, se definieron tres clases o categorías (VIH, enfermedades avanzadas y sujetos control), de tal forma que el conjunto de pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC fueron englobados en una categoría llamada enfermedades avanzadas. Esta categorización, como ha sido publicado en otras investigaciones ayuda a mejorar significativamente el rendimiento de la clasificación y permitió diferenciar las tres categorías globales, pero como el objetivo del estudio era discriminar a todos los grupos de enfermedad, posteriormente se realizó otro modelo de clasificación para conseguir la separación de la clase designada como enfermedades avanzadas y clasificar a los pacientes de acuerdo con un diagnóstico más específico.

Los métodos de clasificación tienen como objetivo definir pautas de clasificación para por medio de ellas asignar los objetos a una de las categorías definidas en el problema que se estudia (a diferencia de las técnicas de modelado de clase, donde los objetos siempre son clasificados en una de las clases predefinidas) [45]. Probablemente, la técnica de reconocimiento de patrones supervisada más aplicada en las investigaciones es el análisis lineal discriminante, ya que es el método más simple de clasificación de todos los métodos que están basados en la aplicación de la regla de Bayes.

Este método estadístico asume que las funciones de densidad de las probabilidades condicionales siguen una distribución normal multivariable y que la matriz de covarianzas de todas las categorías es la misma (homocedasticidad). Estas características permiten que el LDA construya funciones discriminantes no correlacionadas a partir de la información de las variables clasificadoras, logrando la máxima separación entre categorías al maximizar la razón de variabilidad entre-grupos respecto de la variación intra-grupos (criterio de Fisher). De esta manera, cada función discriminante obtenida por el LDA representa una nueva variable (variable canónica), que es combinación lineal de los predictores originales. Cuando hay c categorías, sólo se pueden calcular $(c-1)$ funciones discriminantes independientes. La aplicación posterior de los datos espectrales (variables originales) a cada expresión matemática que define cada una de las funciones discriminantes va a dar como resultado las respectivas posiciones o puntuaciones discriminantes para cada muestra. De esta manera, la regla de asignación que se va a emplear para clasificar los objetos en categorías se basa en la puntuación discriminante más alta que un objeto posee de entre todas las categorías. Por lo tanto, si se asume que la probabilidad de clasificación es la misma en cada grupo, el criterio de clasificación se reduce a calcular la distancia de Mahalanobis (es decir, el objeto se clasifica en la categoría que tiene su centroide más cercano a éste).

La aplicación de dos métodos de selección de variables basados en el análisis lineal discriminante, SLDA y SELECT, permitió optimizar la discriminación realizando simultáneamente la selección de variables y la clasificación de las muestras, es decir, seleccionando primeramente las longitudes de onda consideradas más significativas por el algoritmo para emplearlas posteriormente como entradas en el LDA y conseguir realizar una discriminación fiable entre las clases de pacientes.

Con respecto al método SLDA, se empleó un algoritmo de selección de variables paso a paso con el objetivo de que las variables que presentaban unos valores mayores de discriminación estuviesen formando los grupos de diferenciación. Estas variables fueron seleccionadas empleando como criterio de selección la lambda de Wilks y el estadístico F de Fisher para determinar la importancia de los cambios de la lambda de Wilks al evaluar la influencia de cada nueva variable [46-48].

El procedimiento de selección de variables llevado a cabo por SELECT se basa en la selección iterativa de la variable con el mayor peso de Fisher y posteriormente la decorrelación de esa variable con respecto al conjunto de predictores aún no seleccionados. El procedimiento de decorrelación continúa hasta que el peso de Fisher de los predictores decorrelacionados ya no tiene valor significativo [49]. El objetivo final del SELECT es, por lo tanto, obtener un subconjunto reducido de variables realmente discriminantes que se utilizarán como datos de partida para la construcción del modelo LDA. De esta forma, se evita la introducción en el análisis de ruido y de información redundante, factores que disminuyen la precisión de la clasificación, siendo esta eliminación conseguida gracias al procedimiento iterativo de la ortogonalización.

Con el fin de desarrollar y validar las clasificaciones propuestas, el conjunto completo de muestras disponibles se dividió aleatoriamente en dos subgrupos independientes: un grupo formado por 63 muestras denominado conjunto de entrenamiento (utilizado para optimizar y desarrollar las reglas de clasificación) y un conjunto de 9 muestras que va a ser utilizado como grupo de evaluación externa, ya que estas muestras no van a ser utilizadas para construir el modelo de clasificación, sino para valorar la capacidad predictiva del modelo.

Las principales precauciones adoptadas para confirmar la adecuación de la subdivisión aleatoria realizada se centraron en el análisis de los espectros de IR mediante el análisis de componentes principales y en verificar que las muestras contenidas en el conjunto de entrenamiento cubrían toda la variabilidad del conjunto completo de datos para asegurar la representatividad de todas las clases en la creación del modelo de clasificación. A su vez, se observó que los objetos seleccionados e incluidos en el conjunto externo se distribuían (aproximadamente) de manera uniforme en el espacio creado con las primeras componentes principales construidas a partir del conjunto de

entrenamiento. Las muestras seleccionadas para el conjunto de evaluación fueron las mismas para todos los métodos aplicados y clasificaciones desarrolladas.

Un paso crucial en la selección de variables basadas en LDA es la elección del número de variables con las que se desarrollará el modelo de clasificación. Para evaluar los modelos de clasificación y garantizar la independencia existente entre los grupos de entrenamiento se aplicó la validación cruzada interna utilizando 15 grupos de cancelación. Además, para garantizar el control y evitar el sobreajuste se limitó el número máximo de variables que podían ser elegidas por los algoritmos de selección de variables, de tal manera que el número de muestras del conjunto de entrenamiento debían ser tres veces mayor que el número final de longitudes seleccionadas. La calidad de las reglas de clasificación fue evaluada de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Rendimiento de la clasificación (predicción) total (TR):

$$TR = \frac{\sum_c m_{cc}}{N} \quad (4)$$

- Rendimiento de la categoría c (R_c):

$$R_c = \frac{m_{cc}}{N_c} \quad (5)$$

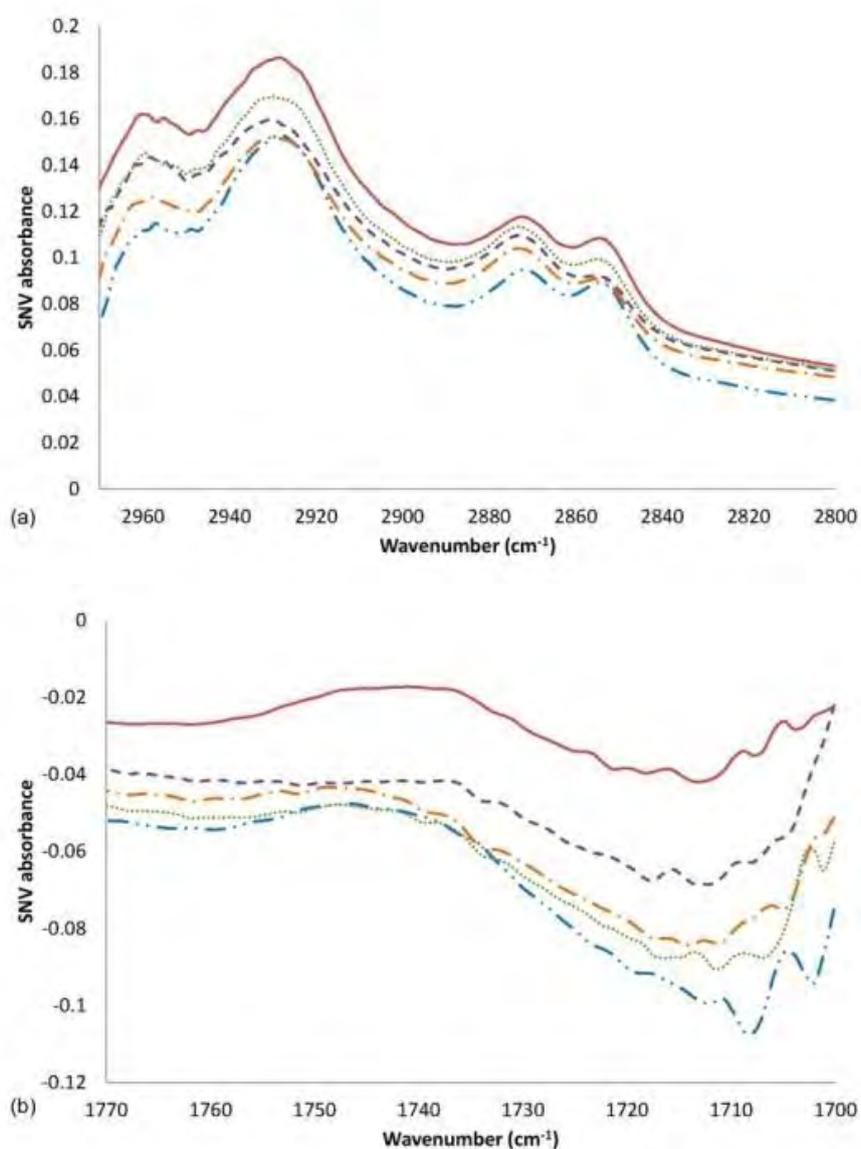
Estas ecuaciones se aplicaron tanto en los modelos de clasificación como en los de predicción (interna/externa), donde m_{cc} es el número de clasificaciones correctas (predicciones) para una determinada categoría c , $\sum_c m_{cc}$ es el número total de clasificaciones correctas (predicciones), N_c es el número de clasificaciones (predicciones) para una cierta categoría c , y N es el número total de clasificaciones (predicciones totales). Se tiene que tener en cuenta que N_c no siempre es igual al número de muestras pertenecientes a la clase c , así como N no siempre representa el número total de objetos, ya que, por ejemplo, un objeto puede ser clasificado varias veces durante la validación cruzada. Para analizar la bondad de los resultados también se utilizaron herramientas gráficas, tales como gráficas que muestran la diferencia entre las puntuaciones o posiciones de las muestras sobre las variables canónicas.

Las clasificaciones Stepwise-LDA y SELECT-LDA se llevaron a cabo utilizando los respectivos programas englobados en el software quimiométrico V-PARVUS [49].

5.2.1.5. Resultados y discusión

5.2.1.5.1. Perfiles espectrales FT-IR

En la Figura 5.2.14 se plasman los espectros de IR de cinco muestras representativas de plasma (una por cada categoría de pacientes analizada en el presente estudio), una vez habían sido pretratados los espectros con el algoritmo SNV. Esta figura está compuesta de tres representaciones separadas, correspondientes a tres zonas espectrales con los siguientes intervalos: 2970-2800, 1770-1700 y 1585-1050 cm^{-1} . Las zonas que no han sido representadas fueron excluidas al ser regiones saturadas o planas que no aportaban información relevante.



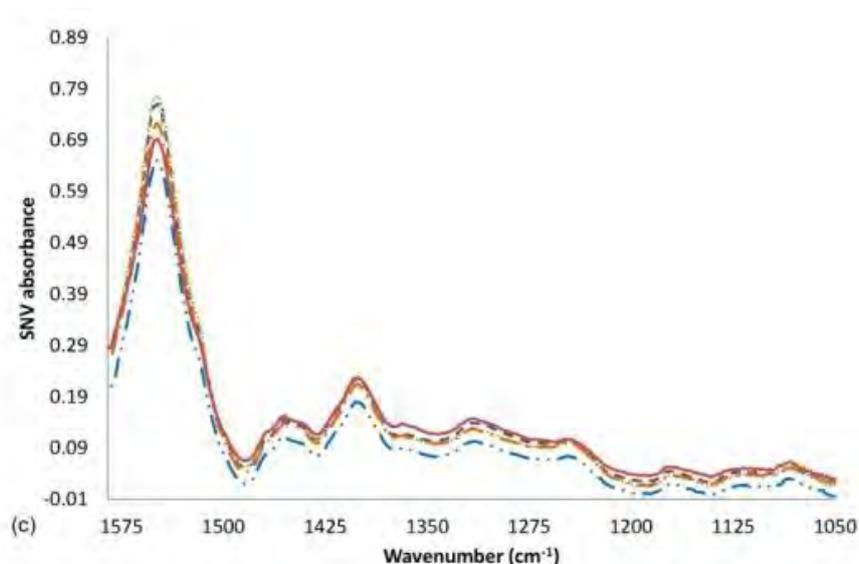


Figura 5.2.14. Espectros de IR pretratados con el SNV de muestras de plasma. Cada espectro era representativo de una categoría de pacientes y para diferenciarlos se trazaron con distinta tipología de líneas, siendo estos trazos los siguientes: VIH (— · ·), SIDA (—), VIH / VHC (— · ·), SIDA / VHC (· · ·) y sujetos control (- - -).

Si se observan estos espectros se hace evidente que sería imposible realizar una discriminación de los pacientes con las distintas etapas de infección por VIH y los sujetos control, considerando únicamente una evaluación visual mediante la comparación de los respectivos perfiles espectrales. Por lo tanto, se deben aplicar adecuadas técnicas quimiométricas que sean capaces de extraer información discriminante contenida en las señales y usarla en el desarrollo de fiables clasificaciones multivariadas.

Las longitudes de onda del IR comprendidas entre 3000 y 2800 cm^{-1} corresponden a bandas de absorción de las vibraciones de estiramiento C-H pertenecientes principalmente a los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ de los ácidos grasos y en una menor contribución a las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Por lo tanto, parece probable que los cambios producidos en las bandas de esta región estarían relacionados con alteraciones diferenciales en el metabolismo de los lípidos inducidos por la infección del VIH en las etapas iniciales o avanzadas de la enfermedad (Figura 5.2.14a). Por otra parte, la banda de absorción alrededor de 1740 cm^{-1} es asignada a la vibración de estiramiento de los enlaces C=O pertenecientes a los ésteres, de tal manera que los cambios en esta absorción serían un reflejo de anomalías lipídicas potencialmente atribuibles a la evolución de la enfermedad VIH (Figura 5.2.14b). La región del espectro IR por debajo de 1500 cm^{-1} es un área compleja que comprende muchas bandas (ocasionadas por las vibraciones fundamentales de muchas biomoléculas significativas que se superponen entre sí), de manera que todas estas vibraciones generan patrones característicos de absorción únicos para cada muestra. Entre las bandas características de esta región, se encuentran los modos normales de estiramiento de los grupos

fosfodiéster de fosfolípidos y ácidos nucleicos (~ 1240 y 1080 cm^{-1}), la vibración de estiramiento de los aminoácidos C-O(H) ($\sim 1120\text{ cm}^{-1}$), las vibraciones de estiramiento de los carbohidratos C-O y tanto los modos de vibración de estiramiento COO como de flexión C-H de lípidos y proteínas. Estos compuestos contribuyen en la creación de un patrón muy complejo de absorciones que contiene una gran cantidad de información valiosa y relevante sobre los cambios metabólicos que se producen durante el inicio y el desarrollo de la enfermedad y está a la espera de ser descifrado gracias a la aplicación de herramientas de análisis de datos multivariantes. De la misma manera, era de esperar que la banda infrarroja específica de las proteínas amida II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) estuviera implicada en la formación de señales concretas en las etapas de infección por VIH, teniendo en cuenta el papel complejo y crucial que desempeñan las proteínas en la progresión de la enfermedad del VIH (Figura 5.2.14c).

5.2.1.5.2. Clasificación global: Enfoque de tres clases para discriminar pacientes con VIH, enfermedades avanzadas y sujetos control

Las pruebas preliminares, correspondientes a los análisis de componentes principales, realizadas sobre los espectros pre-tratados con SNV de los cinco grupos de pacientes estudiados y designados con las distintas categorías no mostraron una clara separación o discriminación entre grupos, principalmente debido al alto grado de superposición entre pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC (Figura 5.2.15). Sin embargo, si estas tres clases superpuestas se fusionaban en una nueva "supercategoría" (llamada en este estudio, enfermedades avanzadas), el gráfico de scores sobre las dos primeras PC explica el 88% de la varianza total de los datos, sugiriendo una notable discriminación entre los pacientes con la enfermedad del VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control. A partir de los resultados obtenidos en estos análisis exploratorios, se rechazó la opción de considerar el problema de clasificación como un enfoque de cinco clases o categorías, ya que este planteamiento conduciría a resultados poco fiables. A raíz de estos resultados, se propuso llevar a cabo un enfoque de clasificación secuencial en dos etapas, de tal manera que se definieron tres clases separadas (es decir, pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control). Los pacientes con enfermedades tales como SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC se agruparon en una categoría conjunta, con el fin de poder realizar posteriormente un estudio de subclasificación centrado únicamente en los tres subgrupos previamente unificados en la supercategoría.

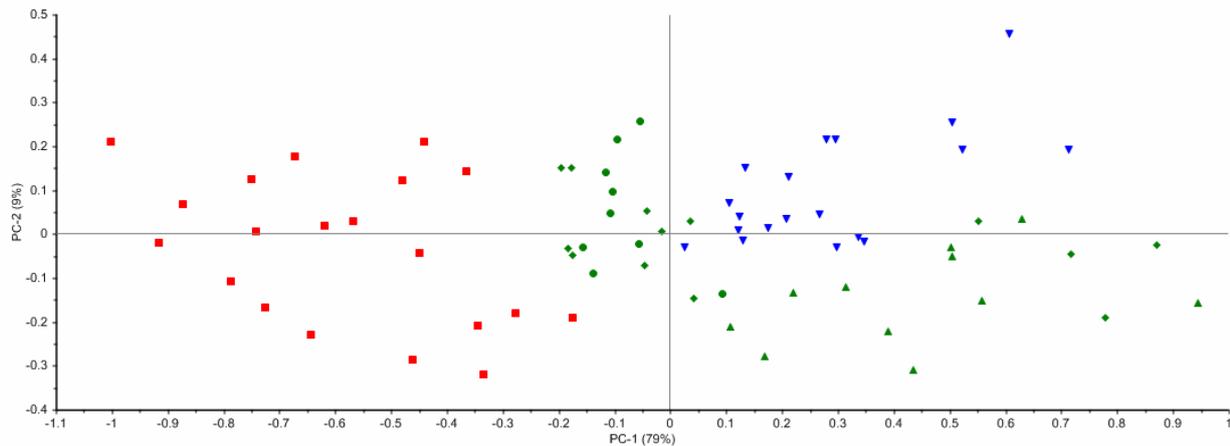


Figura 5.2.15. Puntuaciones de las muestras de plasma de 72 pacientes (conjunto completo de datos) sobre las dos primeras componentes principales que explican la variabilidad en los datos espectrales del IR. Las muestras fueron etiquetadas según su patología específica: VIH (■), SIDA (▲), VIH/VHC (●), SIDA/VHC (◆) y sujetos control (▼).

Se estudió la posibilidad de optimizar los resultados de clasificación utilizando técnicas de selección de variables basadas en LDA, aplicándose tanto los algoritmos SLDA como SELECT sobre los espectros pretratados con SNV, con el fin de reducir las huellas dactilares del IR y extraer las longitudes de onda más significativas para lograr la discriminación entre clases. La validación cruzada se utilizó para optimizar las clasificaciones y, por otro lado, se empleó también la validación externa para evaluar la capacidad predictiva real de los modelos.

Los mejores resultados para la clasificación global se obtuvieron cuando se aplicó el método SLDA, permitiendo efectuar una exitosa discriminación entre pacientes asintomáticos con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control, y reduciendo la información relevante de los espectros IR a 18 variables (longitudes de onda determinantes de los estados de enfermedad). Los resultados de clasificación proporcionaron unos elevados porcentajes de asignación correcta reflejados con los valores del 97.67% en la clasificación global y con un 93.65% en la validación de cruzada (Tabla 5.2.30). La clasificación desglosada por categorías reveló una excelente separación entre las distintas clases, proporcionando un 100% en la clasificación de las muestras de los sujetos control, así como un 94,51% y 98,16% en la clasificación de los pacientes asintomáticos por VIH y pacientes con enfermedades avanzadas, respectivamente. Por otra parte, también se alcanzaron rendimientos de predicción interna muy altos, siendo sus valores comprendidos entre un 82,35% y un 100% para las distintas categorías.

Tabla 5.2.30. Porcentajes de muestras/pacientes correctamente clasificados tanto en la clasificación como en la validación cruzada cuando se aplicó el método SLDA para abordar el enfoque de clasificación global.

Modelo STEPWISE-LDA	Clasificación (%)	Predicción (%)
Pacientes con VIH	94.51	82.35
Pacientes con enfermedades avanzadas	98.16	96.55
Sujetos control	100	100
Rendimiento Total (TR)	97.67	93.65

La capacidad de predicción del modelo de clasificación desarrollado y optimizado utilizando el conjunto de muestras de entrenamiento por el método SLDA fue evaluado—con un conjunto de evaluación externa que estaba compuesto por 9 muestras, distribuidas de la siguiente manera: 3 muestras de pacientes con VIH, 4 de pacientes con enfermedad avanzada y 2 pertenecientes a la categoría de sujetos control. Ocho de las nueve muestras del conjunto de evaluación fueron correctamente clasificadas, confirmando la fiabilidad del modelo y de los criterios de clasificación desarrollados a partir de las 18 longitudes de onda extraídas de los espectros IR para discriminar las tres categorías estudiadas de forma global. Sólo un paciente positivo en VIH fue clasificado erróneamente siendo asignado a la categoría de enfermedades avanzadas. Sin embargo, este hecho no fue un resultado sorprendente, ya que era de esperar que el VIH y el conjunto de enfermedades avanzadas fuesen las dos categorías más cercanas al emplear este enfoque de clasificación global. La categoría de enfermedad avanzada representa un grupo de pacientes en los que la infección por VIH ha evolucionado a condiciones más graves y severas, siendo posible incluso encontrar casos de pacientes que se encuentran en la transición de VIH asintomático a otras etapas de la enfermedad.

La notable separación alcanzada al analizar los pacientes en tres categorías también puede apreciarse visualizando la gráfica correspondiente a las diferencias de scores del LDA (Figura 5.2.16). Este gráfico representa las diferencias de los scores en el espacio definido por la primera y segunda variables canónicas frente a las diferencias entre los scores de la primera y tercera variables canónicas. En particular, se observa que la diferencia entre los scores de la primera y la segunda variables canónicas contribuyó más a la discriminación entre pacientes pertenecientes a la categoría de enfermedades avanzadas y sujetos control, mientras que la diferencia de los scores entre la primera y tercera variables canónicas permitieron separar adecuadamente pacientes con VIH y sujetos control. La separación entre los pacientes asintomáticos del VIH y la categoría de enfermedades avanzadas era evidente en cierta medida que estuviese localizada por una dirección paralela a la bisectriz del tercer cuadrante del gráfico. En esta representación también se puede visualizar la posición del paciente de VIH asignado incorrectamente cuando se realizó el testeó del modelo de clasificación. Este paciente fue

asignado en la categoría de enfermedades avanzadas, pero se puede observar a través de la gráfica que prácticamente está situado muy cercano al límite de ambas clases.

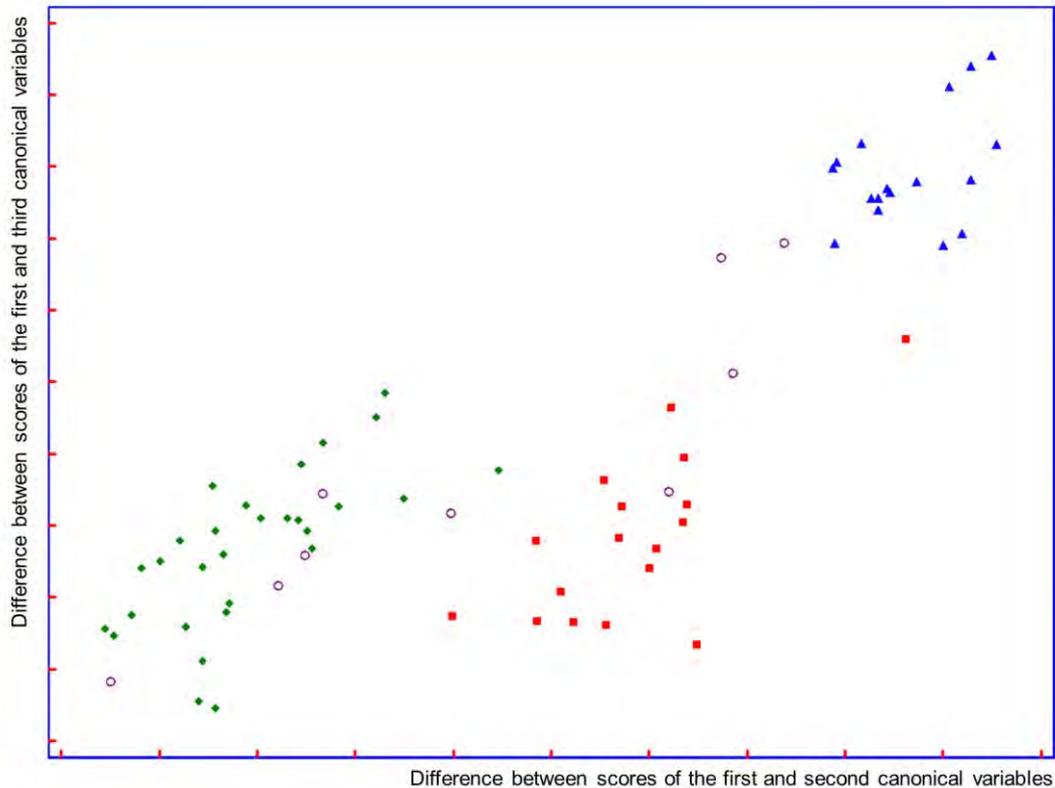


Figura 5.2.16. Representación de las diferencias entre los scores para la discriminación de muestras de plasma después de la realización del algoritmo SLDA para abordar el enfoque de clasificación global. Las tres categorías consideradas fueron etiquetadas como: VIH (■), enfermedades avanzadas (◆) y sujetos control (▲). Las muestras del grupo de evaluación externa se muestran con la representación de círculos (○).

5.2.1.5.3. Estratificación de enfermedades avanzadas: Enfoque de tres clases para discriminar pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC

Una vez alcanzada la discriminación entre pacientes asintomáticos con VIH, pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y controles, se examinó con mayor profundidad la supercategoría, que en una única clase englobaba a tres categorías de enfermedad diferentes (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC). Para ello, se centró el estudio en analizar por separado a estos pacientes con enfermedades avanzadas para intentar clasificarlos según sus patologías específicas.

Los resultados obtenidos al aplicar el algoritmo PCA sobre los espectros pre-tratados con el SNV del conjunto de muestras plasmáticas procedente de los pacientes con enfermedades avanzadas revelaron una clara distribución de los scores sobre las dos primeras componentes principales (Figura 5.2.17).

Esta representación permitió observar una marcada estructuración según las patológicas específicas de los pacientes estudiados, resultados que estimularon el desarrollo de un enfoque de clasificación concreto para estas patologías con el objetivo de abarcar y diferenciar estas tres entidades clínicas.

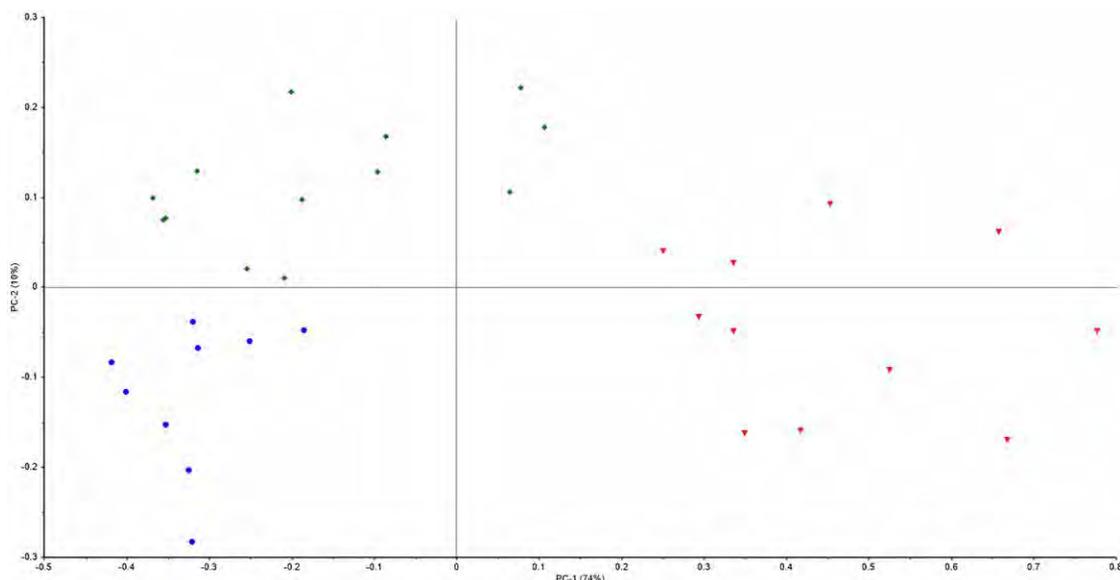


Figura 5.2.17. Representación de los scores de las muestras plasmáticas procedentes de pacientes con enfermedades avanzadas en el espacio definido por las dos primeras componentes principales. Las muestras fueron etiquetadas de acuerdo a su patología específica: pacientes con SIDA (▼), con VIH/VHC (●) y SIDA/VHC (◆).

Fundamentalmente la estrategia de clasificación empleada fue similar a la utilizada en el enfoque de clasificación global, es decir, se comenzó con la selección de variables discriminantes de los espectros de los pacientes con patologías avanzadas para construir un modelo de clasificación basado en el LDA. La selección de un subconjunto de variables verdaderamente discriminantes extraídas de los espectros pre-tratados con SNV fue llevada a cabo mediante los métodos SLDA y SELECT (para conseguir una reducción de las huellas dactilares de IR) con el fin de mejorar la calidad de clasificación en términos de fiabilidad, simplicidad y parsimonia. Como en la clasificación global, la validación cruzada fue utilizada para optimizar las clasificaciones de las muestras, pero en este caso sólo teniendo en cuenta las enfermedades avanzadas, y evaluar el rendimiento predictivo de estas nuevas clasificaciones.

En esta segunda clasificación, se logró la mejor discriminación cuando se empleó la técnica SELECT, ya que permitió generar un conjunto reducido de longitudes de onda decorrelacionadas en base a su peso discriminante. Por esta razón, se obtuvo un conjunto de variables que contenía sólo información relevante (pero no redundante) para la posterior construcción del modelo de clasificación utilizando el LDA. Los resultados plasmados en la Tabla 5.2.31 confirmaron la efectividad de la combinación de los algoritmos SELECT-LDA para lograr la discriminación entre pacientes con etapas avanzadas de la

enfermedad. Esta separación se caracterizó por un alto porcentaje de la clasificación total (99,20%), junto con el de la predicción interna (89,66%).

Tabla 5.2.31. Porcentajes de muestras/pacientes correctamente clasificados tanto en la clasificación como en la validación cruzada cuando se aplicó el método SELECT-LDA para abordar el enfoque de clasificación centrado en las enfermedades avanzadas.

Modelo SELECT-LDA	Clasificación (%)	Predicción (%)
Pacientes con SIDA	100	100
Pacientes con VIH/VHC	100	87.50
Pacientes con SIDA/VHC	97.90	81.52
Rendimiento Total (TR)	99.20	89.66

La calidad mostrada en esta segunda clasificación al aplicar SELECT-LDA cobró una especial relevancia teniendo en cuenta que sólo se seleccionaron y emplearon 9 longitudes de onda (marcadores espectroscópicos) para conseguir una gran discriminación y diferenciación entre las patologías avanzadas. El modelo conseguido adquirió una mayor estabilidad, ya que esta cualidad está asociada al empleo de reducidos números de variables (espacios de baja dimensionalidad).

Además, observando los resultados obtenidos por cada categoría, es importante resaltar que los pacientes con SIDA fueron perfectamente discriminados del resto de pacientes con enfermedades avanzadas (100% de asignaciones correctas tanto en la clasificación como en la validación cruzada). En cuanto a los pacientes que estaban co-infectados con VHC, se podía pensar que iban a mostrar una mayor dificultad a la hora de diferenciar estas patologías avanzadas por estar estrechamente relacionadas, teniendo en común tanto la infección por el virus de la Hepatitis C como la infección por VIH. Sin embargo, se mantuvieron altas capacidades de discriminación, aunque se reflejó una ligera disminución tanto en la clasificación como en la predicción. A su vez, la clasificación se evaluó a través de un conjunto de pruebas externas formado por 1 paciente con SIDA, 1 paciente con VIH/VHC y 2 pacientes con SIDA/VHC. Los resultados obtenidos tras realizar esta evaluación fueron satisfactorios y confirmaron la validez de la clasificación SELECT-LDA desarrollada a partir de 9 longitudes de onda para discriminar las patologías englobadas como enfermedades avanzadas. Sólo 1 paciente del conjunto de evaluación, correspondiente a la patología SIDA/VHC, fue erróneamente asignado, ya que fue clasificado en la categoría de SIDA.

La clara separación observada en la Figura 5.2.18, mostrando las diferencias entre los scores del modelo de clasificación LDA, reforzó la notable discriminación alcanzada entre los subgrupos de enfermedades avanzadas. Podría señalarse que la muestra del conjunto de evaluación mal clasificada, correspondiente a un paciente con SIDA/VHC, probablemente se podría considerar como una "muestra dudosa" (y, por lo tanto, podría ser apropiado

volverla a analizar), ya que se localizó en una posición límite de la gráfica (no concluyente) entre las patologías de SIDA/VHC y SIDA.

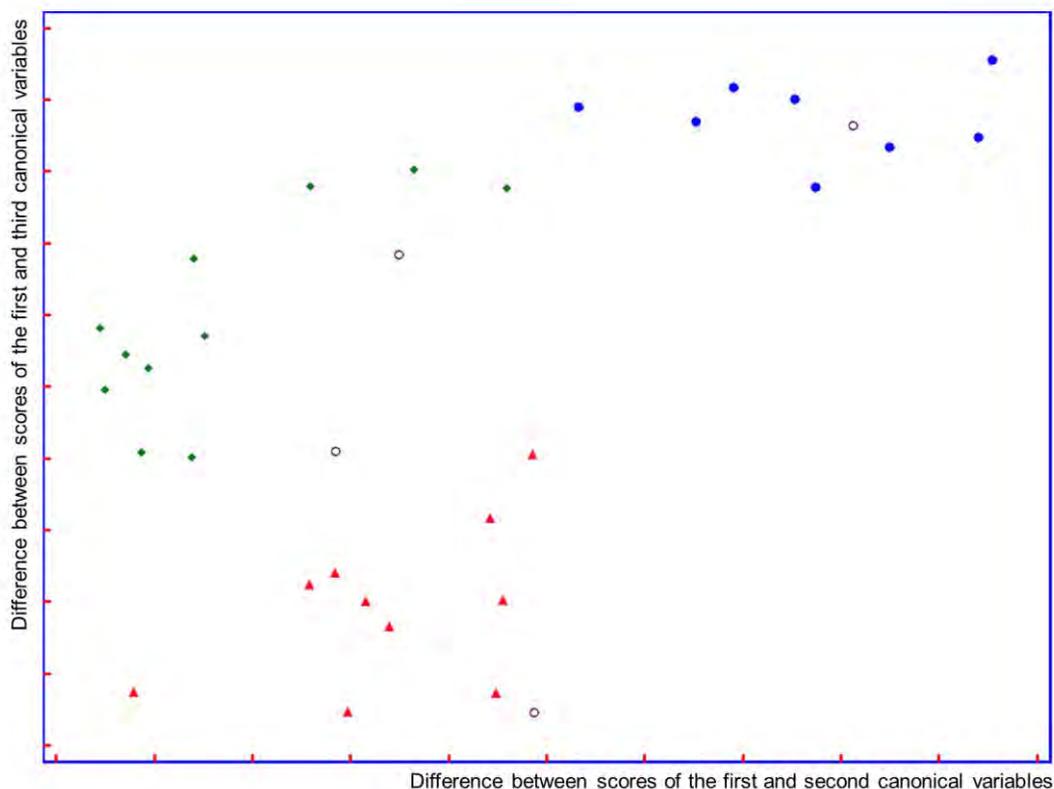


Figura 5.2.18. Representación de las diferencias entre los scores en el espacio definido por las variables canónicas obtenidas a través de las longitudes de ondas previamente extraídas por SELECT para la realización de la clasificación de las enfermedades avanzadas. Las muestras fueron etiquetadas de acuerdo a sus patologías específicas: pacientes de SIDA (▲), VIH/VHC (●) y de SIDA/VHC (◆). Las muestras test se muestran con la representación de círculos (○).

5.2.1.5.4. Selección del conjunto de longitudes de onda: Asignación de bandas e interpretación del significado bioquímico

La selección de determinadas longitudes de onda llevada a cabo por las técnicas SLDA y SELECT únicamente se basó en criterios estadísticos. Sin embargo, fue posible argumentar el sentido bioquímico (espectroscópico) de las variables seleccionadas, con las que se habían creado dos modelos capaces de discriminar diferentes patologías a partir de los dos enfoques de clasificación propuestos en este estudio [50, 51]. La siguiente discusión no pretende ser una recopilación exhaustiva de las absorciones significativas que contribuyen en la caracterización de cada clase de pacientes, sino solamente un razonamiento bioquímico destinado a confirmar la idoneidad de los enfoques de clasificación desarrollados (Tablas 5.2.32 y 5.2.33).

Tabla 5.2.32. Asignaciones bioquímicas de las longitudes de onda con más poder discriminante seleccionadas por el método SLDA para abordar el enfoque de clasificación global, con el objetivo de diferenciar entre pacientes con VIH, enfermedades avanzadas y los sujetos control.

Longitudes de onda (cm ⁻¹)	Modelos Vibracionales	Asignaciones
1743.5216	Estiramiento C=O (ésteres)	Lípidos (ésteres colesterol, fosfolípidos, triglicéridos)
1710.7341 1703.9838 1703.0194	Estiramiento C-O	Bases de los ácidos nucleicos
1576.6913 1558.3688	Cadena Amida N-H (Amida II)	Proteínas
1450.3631 1449.3987 1443.6127 1442.6484	Cadena simétrica CH ₂ Cadena asimétrica CH ₃	Lípidos Proteínas
1407.9323	Estiramiento simétrico COO ⁻	Proteínas (cadenas laterales de aminoácidos) Lípidos (cadenas de ácidos grasos)
1399.2532 1387.6812 1386.7168	Cadena simétrica CH ₃ Cadena asimétrica CH ₂	Lípidos Proteínas
1216.9935	Estiramiento simétrico PO ₂ ⁻	Fosfolípidos Ácidos nucleicos
1146.5969 1124.4171	Estiramiento C-O Estiramiento C-O(H)	Carbohidratos Proteínas (aminoácidos)
1054.0205	Estiramiento simétrico PO ₂ ⁻	Fosfolípidos Ácidos nucleicos

Tabla 5.2.33. Asignaciones bioquímicas de las longitudes de onda con más poder discriminante seleccionadas por el método SELECT-LDA para abordar el enfoque de clasificación para enfermedades avanzadas, con el objetivo de diferenciar entre pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC.

Longitudes de onda (cm ⁻¹)	Modelos Vibracionales	Asignaciones
2930.6206	Estiramiento asimétrico CH ₂	Lípidos (cadenas de ácidos grasos) Proteínas Carbohidratos Ácidos nucleicos
2871.7961	Estiramiento simétrico CH ₃	Lípidos (cadenas de ácidos grasos) Proteínas Carbohidratos Ácidos nucleicos
1702.0551	Estiramiento C-O	Bases de ácidos nucleicos
1570.9052 1568.9766	Cadena Amida N-H (Amida II)	Proteínas
1387.6812	Cadena simétrica CH ₃ Cadena asimétrica CH ₂	Lípidos Proteínas
1129.2388 1107.0591	Estiramiento C-O Estiramiento C-O(H)	Carbohidratos Proteínas (aminoácidos)
1079.0933	Estiramiento simétrico PO ₂ ⁻	Fosfolípidos Ácidos nucleicos

5.2.1.5.4.1. Bandas discriminantes seleccionadas en el enfoque de clasificación global

Una vez que se seleccionaron las 18 longitudes de onda con la estrategia SLDA para crear el modelo de clasificación de pacientes con VIH, sujetos control y pacientes englobados en la categoría de enfermedades avanzadas se proporcionó una visión general de estas bandas de absorción. En la Tabla 5.2.32 se recopila toda la información bioquímica relevante acerca de estas bandas, incluyendo tanto las vibraciones de los enlaces implicados como las respectivas asignaciones bioquímicas.

La relación existente entre la infección por el VIH y las alteraciones producidas en el metabolismo de los lípidos ha sido ampliamente analizada y publicada en investigaciones [52-57]. La dislipidemia desarrollada en los pacientes infectados por VIH, enfermedad definida por la alteración de los niveles lipídicos en sangre (fundamentalmente colesterol y triglicéridos), se caracteriza por concentraciones elevadas de triglicéridos plasmáticos y niveles bajos de HDL [55]. Se ha sugerido que la progresión y evolución del VIH están correlacionadas con el trastorno acentuado de los lípidos plasmáticos, traduciéndose esta alteración en la disminución de los niveles totales de colesterol, de HDL y de LDL. Por otro lado, este virus induce hipertrigliceridemia, enfermedad asociada al incremento de los niveles de colesterol correspondientes a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y al aumento de los ácidos grasos libres liberados al torrente sanguíneo, haciéndose prominentes estas variaciones en los niveles lipídicos a medida que los pacientes progresan de la infección asintomática por VIH al SIDA [56].

Del mismo modo, múltiples estudios han revelado cambios significativos en los niveles de fosfolípidos plasmáticos, ésteres de colesterol y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) durante la infección y evolución de la enfermedad generada por el VIH, pudiéndose relacionar estas alteraciones con el estrés oxidativo [52, 53, 57]. Esta apreciación se puede ver reflejada en 11 longitudes de onda de las 18 variables discriminantes asignadas a componentes y estructuras lipídicas (ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y cadenas de ácidos grasos), logrando destacar el papel relevante que desarrollan los lípidos sanguíneos en la patogénesis del VIH.

En cuanto al metabolismo de las proteínas, la infección por el VIH provoca una compleja desregulación del perfil de las citoquinas tanto en el plasma como en los tejidos [56, 58, 59]. Las funciones características que desarrollan las citoquinas en la comunicación intercelular y en la activación de receptores específicos de membrana hacen que estas proteínas sean un blanco para el virus VIH por su capacidad de regulación en el mecanismo de inflamación, requerido por el virus a lo largo del transcurso de la enfermedad. Por esta razón, debe ser observado algún tipo de variación en las bandas de absorción

de este tipo de proteínas para reflejar cambios metabólicos asociados a los mismos. A su vez, se ha demostrado que durante la infección por el VIH se produce una descompensación en las proteínas del organismo, llegando al agotamiento de algunas de ellas, así como de la deficiencia en la hormona del crecimiento o la alteración en los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda, proteínas que forman parte del sistema inmune innato [60, 61]. Tanto los cambios en la cinética de estas últimas proteínas mencionadas como las alteraciones que llevan asociadas sus desequilibrios permiten relacionarlas con la gravedad y progresión de la enfermedad. Por esta razón, el gran número de longitudes de onda que se incluyen como variables significativas en la discriminación de las patologías estudiadas son absorbancias asociadas a las vibraciones típicas de las estructuras proteicas (Amida II y aminoácidos). Este resultado puede ser justificado a través del papel que juegan las proteínas tanto en la modulación de la replicación del VIH como en la progresión de la enfermedad.

La infección por el VIH también está correlacionada con anomalías en el metabolismo de los carbohidratos, principalmente por la resistencia a la insulina como consecuencia a los defectos del metabolismo de lípidos y a una prevalencia mayor de glucosa, ocasionando un aumento en la tolerancia de este compuesto para estos pacientes [62-64]. Por lo tanto, la selección de dos longitudes de onda como variables significativas, definidas por la vibración del estiramiento del enlace C-O, es atribuible a residuos de carbohidratos y, a su vez, vinculada a los trastornos glucémicos en pacientes con VIH.

Por otra parte, numerosos estudios desarrollados en la actualidad apoyan la hipótesis de que los lipopolisacáridos presentes en la circulación sanguínea (LPS) revelan el aumento de la infección por el VIH y el progreso de la enfermedad mediante el mecanismo de la translocación microbiana [65]. De esta manera, y teniendo en cuenta que, en términos estructurales, un LPS está formado por una sección lipídica (lípidos A), un polisacárido de núcleo y un antígeno O-polisacárido, es razonable que aparezcan cambios en ciertas absorciones inducidas por estos componentes en el plasma, correspondientes a las longitudes de onda seleccionadas de las huellas dactilares del IR (por ejemplo, las vibraciones de estiramiento de CH y PO_2^- estarían asociadas con la subestructura del lípidos A, mientras que la vibración de estiramiento de C-O puede atribuirse a los polisacáridos).

Por último, durante casi dos décadas, se ha establecido que la carga viral plasmática, medida a través de la concentración de ARN vírico asociado al virión del VIH en plasma, está estrechamente correlacionada con la etapa de la enfermedad [66]. Por consiguiente, los niveles de ARN-VIH que circulan por el organismo pueden ser empleados como marcadores del VIH y la progresión de esta enfermedad, siendo asociados estos marcadores con diversas longitudes de onda correspondientes a bandas de ácidos nucleicos (estiramiento C-O de

bases nucleicas y estiramiento simétrico PO_2^- de fosfatos), con el fin de discriminar entre pacientes asintomáticos con VIH, pacientes avanzado en la enfermedad y los sujetos control.

5.2.1.5.4.2. Bandas discriminantes entre las etapas avanzadas de la enfermedad

La aplicación del algoritmo SELECT combinado con el método de clasificación LDA destacó por crear un modelo caracterizado con un gran rendimiento en la discriminación de los pacientes infectados por SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC, siendo construido este modelo con tan sólo 9 longitudes de onda. Estas bandas de absorción relevantes correspondieron a las vibraciones características de los grupos estructurales de las biomoléculas plasmáticas más significativas de los pacientes estudiados, resumidas en la Tabla 5.2.33.

En esencia, las subregiones espectrales y las absorciones implicadas en la discriminación de las categorías englobadas en el grupo de enfermedades avanzadas eran bastante similares a las seleccionadas en el enfoque de la clasificación global. Únicamente se produjo una contribución diferencial en un par de longitudes de onda entre 3000 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} que podría estar parcialmente vinculada a compuestos lipídicos y cadenas laterales de aminoácidos mediante la vibración del estiramiento de los grupos funcionales CH_2 y CH_3 , aunque estas bandas también pueden ser asociadas a otra serie de compuestos como son los carbohidratos y los ácidos nucleicos. Sin embargo, a pesar de la similitud encontrada en las longitudes de onda entre los rangos espectrales de los dos enfoques de clasificación propuestos, era de esperar que el subconjunto reducido de números de onda elegidos en esta última etapa de clasificación reflejase los cambios metabólicos específicos de la progresión del VIH al SIDA y asociados a la carga viral de la co-infección por VHC.

Teniendo en cuenta que, como se ha mencionado anteriormente, tanto las alteraciones en el metabolismo de los lípidos como de las proteínas parecen ser más marcadas en los estadios avanzados de la infección por VIH, la selección de múltiples vibraciones atribuibles a estructuras lipídicas y proteínicas es esencial para lograr la diferenciación entre pacientes co-infectados por VIH y VHC y pacientes con SIDA (independientemente del estado de infección con respecto al VHC). Del mismo modo, el hecho de que se produzca un desarrollo menor de dislipidemia entre los pacientes co-infectados con el VIH y el VHC que entre los pacientes mono-infectados, resaltó la relevancia de ciertas bandas espectrales de diferentes estructuras lipídicas que son capaces de lograr una separación clara entre las categorías con y sin co-infección. Con este mismo propósito, parece que las vibraciones de las proteínas seleccionadas también desempeñan un papel importante, apoyado por los hallazgos obtenidos en investigaciones predecesoras que han

demostrado que, en comparación con la mono infección por VIH, la co-infección por VHC tiene un impacto significativo en la regulación de las lipoproteínas plasmáticas. La co-infección a nivel proteínico se refleja en la mejora en la producción de citoquinas y la disfunción inmune, en la aceleración de la deficiencia de proteínas, así como en los niveles menores de proteína C reactiva [67].

De manera similar, la considerable importancia atribuida a las bandas relacionadas con los carbohidratos como marcadores significativos refleja la vulnerabilidad existente en torno a los trastornos glucémicos inducidos por la infección del VIH y los diferentes grados de desarrollo de estas alteraciones estudiadas (por ejemplo, en los pacientes co-infectados con VHC tienen más riesgo de sufrir diabetes, así como una predisposición de resistencia a la insulina en comparación con el resto de pacientes estudiados) [68, 69].

Por otra parte, las variaciones en algunas bandas de IR asignadas tentativamente a vibraciones de lípidos y de carbohidratos y, por lo tanto, posiblemente vinculadas a las subestructuras de los LPS, podrían haber contribuido a discriminar a los pacientes mono infectados entre sí (con VIH o SIDA), teniendo en cuenta que el nivel plasmático de LPS (como marcador de translocación microbiana) está asociado con el curso clínico de las personas infectadas por el VIH. Además, las vibraciones espectrales potencialmente atribuidas a los componentes de LPS también podrían estar involucradas en la separación de pacientes infectados por el VIH y co-infectados, teniendo en cuenta que la translocación microbiana asociada al VIH se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad hepática mediada por el VHC [70].

Por último, la implicación de las vibraciones probablemente atribuibles a los ácidos nucleicos (es decir, tanto al ARN vírico del VIH como del VHC) en el segundo enfoque realizado para la discriminación de las enfermedades avanzadas queda plenamente justificado dado que, por un lado, la carga viral plasmática sigue siendo el mejor marcador del VIH (contribuyendo así a distinguir a los pacientes en su fase de desarrollo, pudiéndose clasificar antes y después de la aparición del SIDA) y, por otro, que la enfermedad plasmática inducida por el VHC se utiliza para el diagnóstico y la monitorización del tratamiento de la hepatitis C (contribuyendo así a discriminar la categoría definida como mono infectados por SIDA y los pacientes que desarrollan ambas infecciones, VIH/VHC o SIDA/VHC) [71].

5.2.1.6. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado que la espectroscopia FT-IR aplicada sobre muestras de plasma humano (matriz mínimamente invasiva y de gran valor metabólico) combinada con métodos adecuados de selección de variables y con técnicas de clasificación como el LDA proporciona una estrategia óptima de discriminación para diagnosticar VIH, y para fines de

estadificación en pacientes infectados con este virus. Además, logró determinar la presencia o ausencia de co-infección por VHC tanto en las poblaciones seropositivas al VIH como al SIDA. El proceso que engloba tanto espectroscopia IR como el sistema de clasificación estudiado mediante dos enfoques se caracteriza por ser rápido, limpio y relativamente barato, ya que sólo se basa en mediciones de muestras serológicas no tratadas y de tratamientos de datos estadísticos. La fuerza principal del enfoque metabólico propuesto en este estudio no radica en la selección e identificación de marcadores de enfermedades individuales, sino en la extracción de huellas espectroscópicas / metabólicas específicas de cada etapa de enfermedad que pueden derivar en significativos cambios tanto agudos, sinérgicos como antagonistas con respecto a la amplia variedad de compuestos bio-activos involucrados en la patogénesis del VIH.

5.2.2. Análisis lipidómico para descubrir y caracterizar potenciales biomarcadores en pacientes con diferentes etapas de infección por VIH y co-infección por VHC mediante UPLC-ESI-QTOF/MS

5.2.2.1. Introducción

El VIH ha sido diagnosticado a millones de personas en todo el mundo con tasas de mortalidad muy altas y, por otra parte, ocasiona un impacto muy pronunciado en la calidad de vida de los pacientes seropositivos. La falta de comprensión detallada de los mecanismos de replicación del virus ha impedido el diagnóstico, la prevención, el control y el tratamiento de los brotes virales y ha acompañado al crecimiento y propagación de esta enfermedad [72].

Los virus no pueden reproducirse por sí mismos, deben de introducir su genoma viral en el núcleo de las células anfitrión mediante la integración del ADN del virus en las propias células para su replicación. En este proceso están involucradas proteínas y lípidos de las células huésped que proporcionan una estructura adecuada como soporte para la replicación del mismo, ocasionando múltiples anomalías metabólicas en los pacientes, dando como resultado una alteración de los metabolitos [73, 74]. La alteración de los niveles lipídicos puede desarrollar la lipodistrofia, hipertrigliceridemia, dislipidemia y resistencia a la insulina entre otras enfermedades [75]. En este contexto, la lipidómica está emergiendo como una ciencia esencial para la comprensión de las funciones específicas de las especies lipídicas en los sistemas biológicos y complementa el conocimiento adquirido a través de la genómica y la proteómica [76]. Los estudios lipidómicos proporcionan una herramienta útil para la detección de biomarcadores lipídicos, compuestos que poseen niveles alterados y están asociados a cambios inducidos por las enfermedades o trastornos [77]. Gracias a la disponibilidad de plataformas analíticas, las investigaciones clínicas han mejorado y evolucionado consiguiendo detectar y cuantificar un gran número de especies lipídicas moleculares. Además, los avances que se han producido en el análisis matemático permiten tratar eficazmente la gran cantidad de datos de alta dimensionalidad que se obtienen en los análisis de muestras y, por otro lado, los amplios recursos a nivel molecular permiten obtener una interpretación biológica adecuada de los resultados [78-80].

En las investigaciones realizadas en el campo lipidómico se han utilizado diferentes técnicas analíticas para el análisis de muestras como son: la resonancia magnética nuclear (RMN) [81], cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) [82] y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) [83]. Entre estas técnicas analíticas se debe destacar que la técnica más adecuada para el análisis del perfil lipídico no dirigido de muestras biológicas es la LC-MS [84]. Esta técnica permite la separación de los diferentes compuestos que constituyen una muestra a través

de la protonación o desprotonación de diferentes estructuras lipídicas mediante el uso de fuentes de ionización (electronebulización), para posteriormente detectar esos lípidos por medio de la técnica de análisis de espectrometría de masas [85]. Los perfiles obtenidos por esta técnica se caracterizan por aportar grandes cantidades de datos que pueden ser procesados y analizados estadísticamente con herramientas quimiométricas [86].

Los lípidos son pequeños compuestos formados por moléculas orgánicas hidrófobas o anfipáticas, cuyas principales funciones biológicas son el almacenamiento de energía, señalización o componentes estructurales de las membranas celulares. De acuerdo con LIPIDMAP, los lípidos se clasifican en 8 categorías con respecto a su complejidad estructural y biosintética: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, lípidos preniles, sacarolípidos y policétidos [78, 87]. Estos compuestos desempeñan funciones biológicas esenciales en el cuerpo humano, por esta razón, cambios o alteraciones anormales en sus niveles desarrollan enfermedades como la diabetes, la aterosclerosis, la obesidad... [77, 88] Investigaciones previas focalizaban su punto de mira en análisis de enfermedades que no tienen origen viral, pero que provocaban alteraciones lipídicas. Ante la repercusión e importancia que tienen las enfermedades virales en la sociedad, esta investigación pretende explicar mediante un análisis comparativo la trascendencia que tienen los cambios lipídicos provocados por agentes virales como son el VIH y el VHC.

En particular, el objetivo de este estudio fue identificar los niveles lipídicos alterados en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH que presentaban diferentes estadios de infección y co-infección con VHC mediante la plataforma analítica UPLC-MS. A su vez, ante los resultados obtenidos se pudieron sugerir y establecer posibles biomarcadores de las enfermedades analizadas. Para la realización de esta investigación fueron seleccionados los siguientes grupos de cohorte: i) pacientes asintomáticos infectados por el VIH (VIH); ii) pacientes infectados por el VIH que habían desarrollado SIDA (SIDA); iii) Pacientes infectados por el VIH y co-infectados con hepatitis C (VIH/VHC); iv) Pacientes con SIDA y co-infectados con VHC (SIDA/VHC) y v) sujetos control (Control).

Los hallazgos logrados con este estudio contribuyen notablemente a la clasificación y diferenciación de varios grupos de enfermos con diferentes estadios de infección de una de las principales enfermedades que afectan actualmente a la población mundial y al descubrimiento de biomarcadores potenciales que tienen la capacidad de detectar estas enfermedades.

5.2.2.2. Desarrollo experimental

En lo referente a reactivos, preparación de las soluciones lipídicas, almacenamiento y manipulación de las muestras de plasma, preparativa de las muestras y extracción de lípidos por el método MTBE-USAE se remite al Capítulo 4 (Desarrollo experimental). También en ese capítulo se ha incluido las condiciones experimentales utilizadas en la cromatografía líquida.

5.2.2.3 Estudio de la población

Todos los pacientes estudiados en la presente investigación fueron sometidos a diversas pruebas en el Área de Enfermedades Infecciosas, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, para la detección del VIH y VHC. Tras la detección de los virus, los pacientes fueron separados con respecto al grado de la enfermedad. Según los resultados aportados por esta área de análisis clínico, veintiún pacientes fueron clasificados como clínicamente asintomáticos al estar infectados por el VIH, 9 pacientes fueron englobados como co-infectados por el VIH y VHC, 11 pacientes habían desarrollado SIDA, 13 pacientes formaron el grupo denominado SIDA/VHC al presentar ambas enfermedades y, por último, se consideraron 20 sujetos control que no poseían las enfermedades diana en este estudio.

Para la realización de esta investigación se obtuvo el consentimiento de todos los pacientes y la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital San Pedro de La Rioja.

5.2.2.4. Análisis de los datos e identificación de lípidos

Tras conseguir la matriz de los picos a través del procesado de los cromatogramas con los paquetes bioinformáticos, se tuvo que eliminar como siguiente paso el ruido de fondo. Esta eliminación se realizó mediante la resta de las masas detectadas en los cromatogramas correspondientes a las muestras de blanco sobre las matrices de los cromatogramas de los extractos lipídicos. De esta manera, se pudieron obtener los picos representativos de las muestras analizadas.

Una vez realizada la eliminación del ruido, estos datos brutos se sometieron al pre-tratamiento de autoescalado y se analizaron utilizando el PCA. Este tratamiento tiene la capacidad de transformar el conjunto original de variables en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas llamadas PCs. Entre los objetivos de esta técnica está el de retener la mayor información de las variables originales y proporcionar una visión general de las muestras y sus interrelaciones. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software quimiométrico The Unscrambler (versión X 10.3, Camo ASA, Oslo, Noruega).

Un parámetro determinante que debe de definirse antes de construir cualquier modelo de clasificación es considerar el número de categorías que va a tener y establecer los requisitos particulares que una muestra debe cumplir para ser asignada a una determinada clase. En este estudio se utilizaron como estrategia dos modelos de clasificación conformados por diferentes categorías de enfermedades. En una etapa inicial se llevó a cabo una clasificación global donde fueron definidas y agrupadas las muestras en tres clases (pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control), englobando a los pacientes con SIDA y co-infectados VIH/VHC y SIDA/VHC en una categoría conjunta designada como enfermedades avanzadas. Este enfoque adoptado en la clasificación global permitió mejorar el rendimiento de la clasificación y la discriminación entre las clases previamente fijadas. Posteriormente, después de lograr la diferenciación inequívoca entre las tres categorías de pacientes (VIH, enfermedades avanzadas y Control), se profundizó en la discriminación de las clases más difíciles de interpretar, centrando el análisis en los pacientes que pertenecían a la clase definida como enfermedades avanzadas (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC).

Previamente se aplicó un método de selección de variables sobre la metodología de análisis discriminante denominado *stepwise orthogonalization of predictors* (SELECT). Esta técnica permitirá obtener un conjunto de variables con una alta correlación con respecto a la respuesta y así evitar las interferencias de variación sistemática no relacionada con la respuesta [49]. La selección de variables con este tratamiento es realizado mediante la decorrelación de las variables con respecto al conjunto de los predictores (variables con mayor peso de Fisher).

Tras aplicar este algoritmo, las variables obtenidas por medio de SELECT para los dos modelos de clasificación se utilizaron como datos de partida en los métodos de clasificación, LDA y QDA. Estos algoritmos permiten a través del conjunto de variables cromatográficas reducidas clasificar las muestras analizadas (muestras biológicas de pacientes) y crear modelos óptimos de predicción. Los métodos de clasificación LDA y QDA son técnicas que emplean límites discriminantes lineales y cuadráticos para establecer los criterios que debe de cumplir cada una de las muestras para pertenecer a un grupo conciso. Para ello, estas técnicas construyen funciones discriminantes no correlacionadas a partir de la combinación de variables clasificadoras, otorgando la máxima separación posible entre clases en comparación con la variación que se obtiene dentro de la clase o categoría [47]. Estos modelos fueron evaluados mediante LOO-CV con el fin de obtener modelos que minimizasen la tasa de clasificación errónea.

Los estudios estadísticos multivariados empleados para tratar los datos cromatográficos en este estudio: métodos de selección de variables,

clasificación y técnica de validación (SELECT, LDA, QDA, LOO-CV) se realizaron con el software quimiométrico V-PARVUS 2011 [89].

La identificación de los lípidos discriminantes obtenidos como resultado del algoritmo SELECT se realizó mediante la búsqueda de los fragmentos y las masas de los iones en las distintas bases de datos on-line disponibles: HMDB, LIPIDMAPS, METLIN y KEGG. Los resultados obtenidos con estas bases de datos fueron complementarios entre sí y la fragmentación de los iones fue extremadamente útil para garantizar una correcta identificación.

Una vez obtenidos los modelos de clasificación, se construyeron curvas ROC (característica operativa del receptor) para evaluar el área bajo las curvas ROC (AUC) e interpretar y determinar los lípidos plasmáticos con mayor poder discriminante. A partir de los valores AUC se pudo establecer los biomarcadores relevantes en la discriminación y diagnóstico de los pacientes con las distintas patologías estudiadas. Las curvas ROC se construyeron utilizando el paquete pROC disponible en el lenguaje de programación R [90].

5.2.2.5. Resultados y discusión

5.2.2.5.1. Caracterización lipidómica en pacientes con diferentes etapas de la infección por el VIH y VHC

El descubrimiento de biomarcadores es una estrategia crítica y útil tanto para el diagnóstico de enfermedades como para su seguimiento, de la misma forma, que permite averiguar cómo los tratamientos terapéuticos afectan al organismo. Por esta razón, los cromatogramas obtenidos de los perfiles lipídicos correspondientes a las muestras plasmáticas de los pacientes analizados fueron recogidos en los dos modos de ionización, positivo y negativo. Posteriormente, estos datos fueron procesados empleando técnicas de análisis estadístico multivariado para confirmar la presencia de diferencias lipídicas relevantes entre las muestras analizadas.

5.2.2.5.2. Clasificación global por cromatografía: Enfoque que engloba tres categorías para discriminar a los pacientes con VIH, enfermedades avanzadas y sujetos control

Los datos cromatográficos fueron examinados con un análisis no supervisado, a través del PCA, algoritmo que permitió mostrar la visualización y comparación de las muestras a estudio en una fase previa a la clasificación. En la Figura 5.2.19 se muestran los scores de las muestras de plasma sobre la PC1 frente a PC2, esta representación permite visualizar una clara separación entre pacientes con VIH, sujetos control y pacientes con SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC. Este PCA fue muy relevante para afrontar la metodología de clasificación con respecto a las clases que se tenían definir debido a la existencia de una separación entre clases. Por esta razón, se abordó un

enfoque considerando tres categorías de sujetos para realizar una clasificación global con todas las muestras, diferenciándose los pacientes con VIH, los sujetos control y una categoría denominada enfermedades avanzadas, que englobaba a los pacientes con estados de enfermedad avanzada o co-infectados con VHC (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC).

Teniendo en cuenta la alta dimensionalidad que poseían los datos cromatográficos y la dificultad de extraer información de estos perfiles lipídicos se utilizó el algoritmo SELECT como metodología de cribado con el fin de obtener un conjunto de variables óptimas para la discriminación entre pacientes. Estas variables con alto poder discriminante fueron, a continuación, empleadas en la construcción del modelo de clasificación, aplicando la técnica de clasificación que se basa en aproximaciones cuadráticas. Los resultados obtenidos tras la combinación de los algoritmos SELECT-QDA lograron con éxito la separación de las muestras entre las categorías definidas, mostrando unos valores satisfactorios reflejados por los altos porcentajes de clasificación y predicción interna.

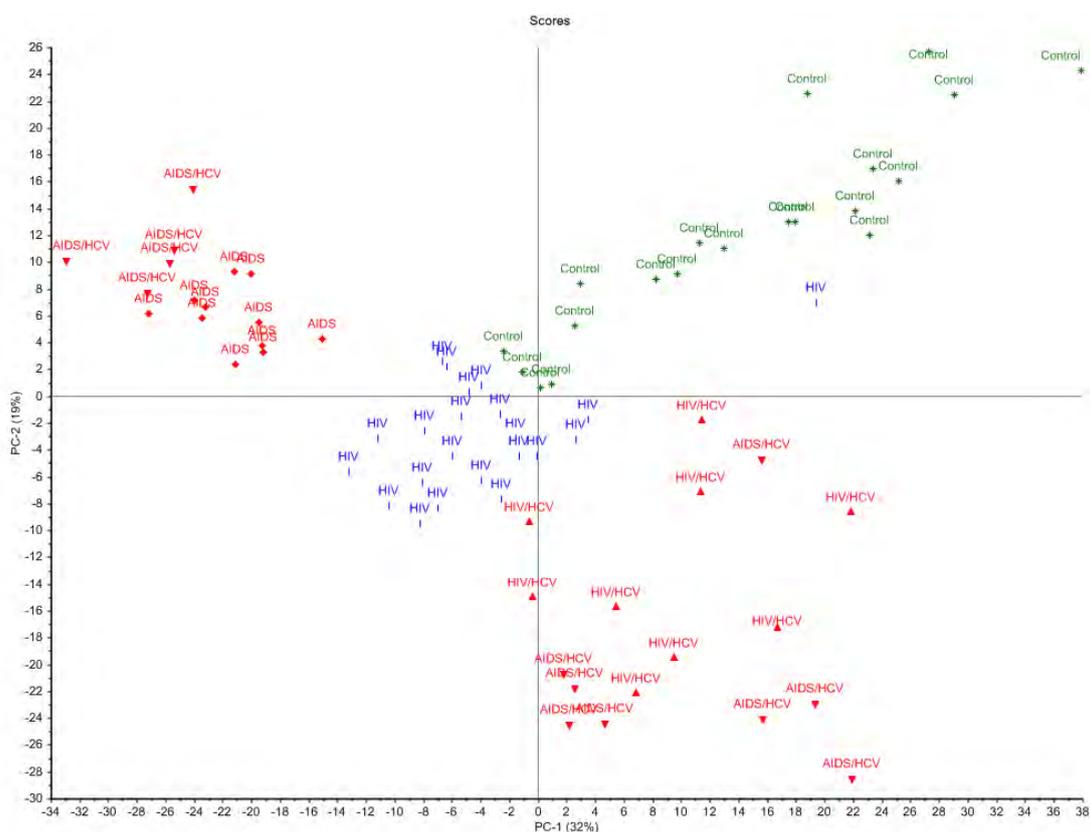


Figura 5.2.19. Resultados obtenidos con el PCA al analizar las muestras de plasma de los pacientes estudiados en las dos primeras componentes principales, siendo estos pacientes separados en tres categorías: pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control.

En la Tabla 5.2.34 se muestran los poderosos valores de clasificación y predicción del modelo SELECT-QDA, correspondiendo los rendimientos de

clasificación en un 100% para los sujetos control, un 100% para los pacientes con VIH y un 96.97% para los pacientes con enfermedades avanzadas, reflejando este modelo un rendimiento de clasificación total del 98.65%. Además, este modelo mostró una alta capacidad de predicción entre un 90-96.97% para los mismos grupos de pacientes, logrando un rendimiento de predicción total del 94.59%. La validación realizada en este modelo tanto para la clasificación como la predicción fue la LOO-CV.

Tabla 5.2.34. Porcentajes de clasificación y predicción correspondientes al modelo QDA desarrollado para el enfoque global de clasificación con tres categorías (pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control).

Modelo SELECT-QDA	Clasificación (%)	Predicción (%)
Pacientes con VIH	100	95.24
Pacientes con enfermedades avanzadas	96.97	96.97
Sujetos control	100	90
Rendimiento Total (TR)	98.65	94.59

Las Figuras 5.2.20a y 5.2.20b muestran las gráficas de Coomans correspondientes al modelo de clasificación. La Figura 5.2.20a recoge en su parte inferior únicamente las muestras de sujetos control, permitiendo por esta localización de la categoría estudiada manifestar que es aceptada por el modelo. En esta misma figura se observa en la zona superior izquierda la mayoría de las muestras que engloban la categoría denominada enfermedades avanzadas, siendo esta categoría también aceptada por el modelo. Esta gráfica plasma la capacidad que posee el modelo para discriminar entre sujetos control (no infectados por los virus analizados) y personas enfermas por el VIH, ya que las distancias entre las clases del modelo permiten la realización de una clasificación de las muestras a través de áreas bien definidas.

Por otro lado, la Figura 5.2.20b muestra el gráfico de Coomans correspondiente a las mismas categorías estudiadas, pero en este caso son representados como categorías aceptadas las muestras de los pacientes con VIH frente a los sujetos control. Este gráfico se encuentra dividido por una zona inferior correspondiente a las muestras aceptadas por el modelo pertenecientes a la clase asignada como sujetos control y la zona lateral izquierda correspondiente a los pacientes con VIH. En esta representación se puede observar que en el área no definida por el modelo se encuentran localizadas las muestras pertenecientes a la categoría denominada enfermedades avanzadas, expresando que esta categoría no está asignada en el modelo.

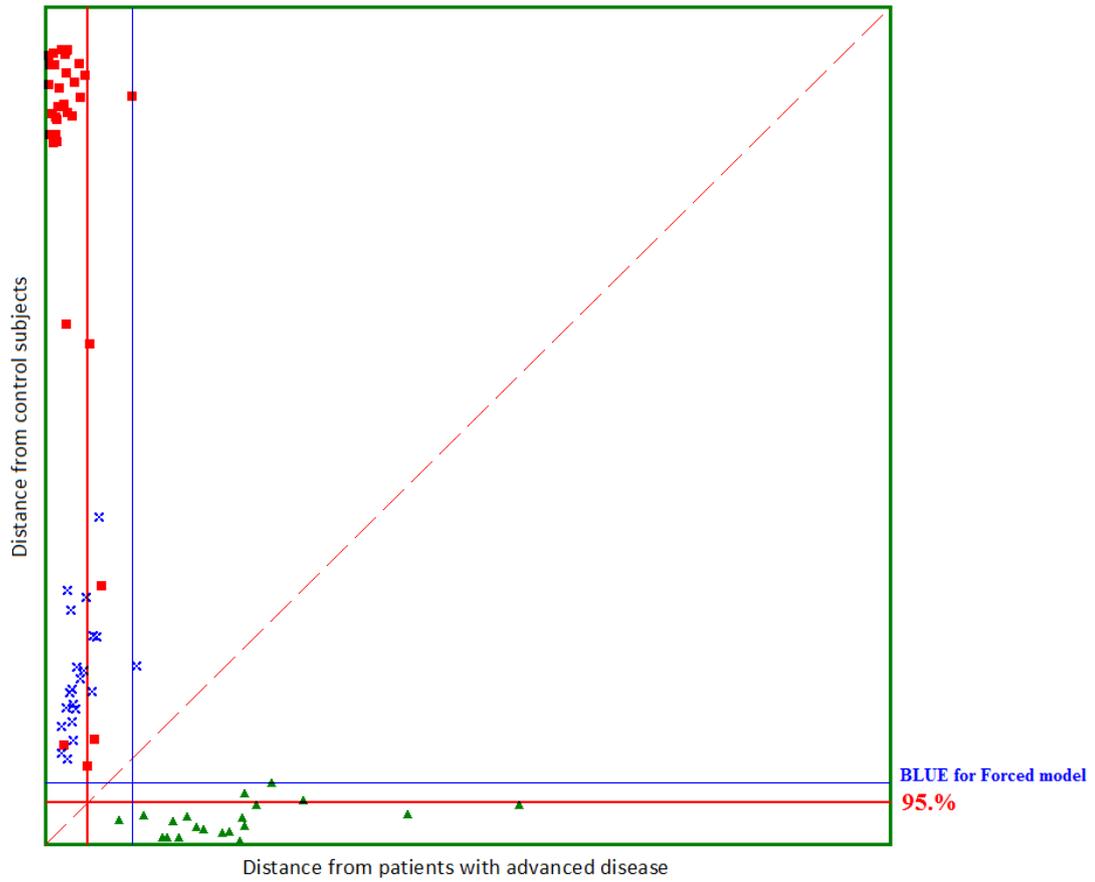


Figura 5.2.20a. Gráfica Coomans del modelo de clasificación global (distancia de pacientes con enfermedades avanzadas vs distancia de sujetos control) construido a partir de los picos detectados de las muestras pertenecientes a pacientes con VIH (x), enfermedades avanzadas (■) y sujetos control(▲).

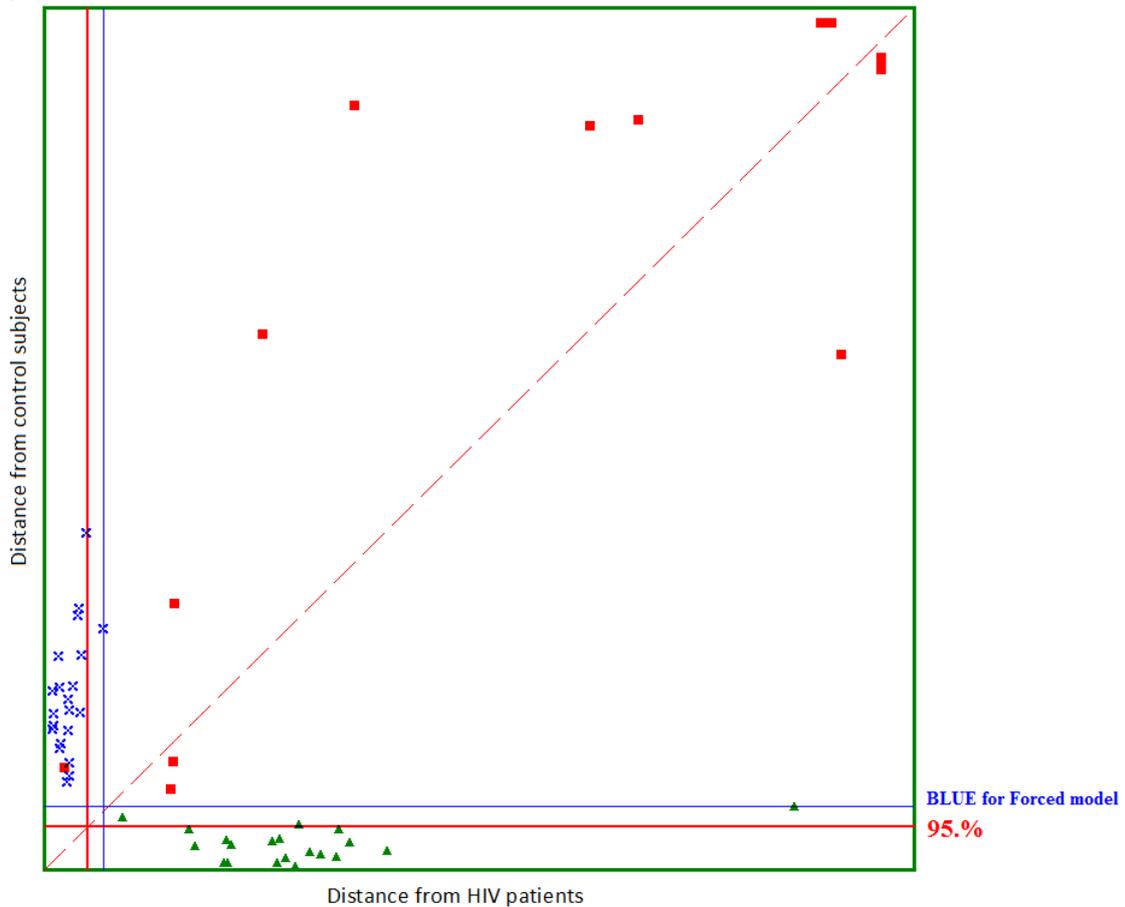


Figura 5.2.20b. Gráfica Coomans del modelo de clasificación global (distancia de pacientes con VIH vs distancia de sujetos control) construido a partir de los picos detectados de las muestras pertenecientes a pacientes con VIH (x), enfermedades avanzadas (■) y sujetos control (▲).

5.2.2.5.3. Enfoque de clasificación definido por tres categorías con el fin de discriminar el grupo de pacientes con enfermedades avanzadas (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC) mediante perfiles cromatográficos

Tras los buenos resultados alcanzados con el análisis realizado en la clasificación global, en este punto se seguirá la misma estrategia empleada, pero centrando el estudio en la clasificación exclusivamente del grupo de enfermedades con estadios avanzados inducidos por el VIH, así como co-infectados con VHC.

Por lo tanto, como paso previo se realizó un PCA para visualizar la posible separación existente entre los pacientes pertenecientes a estas categorías: SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC (Figura 5.2.21).

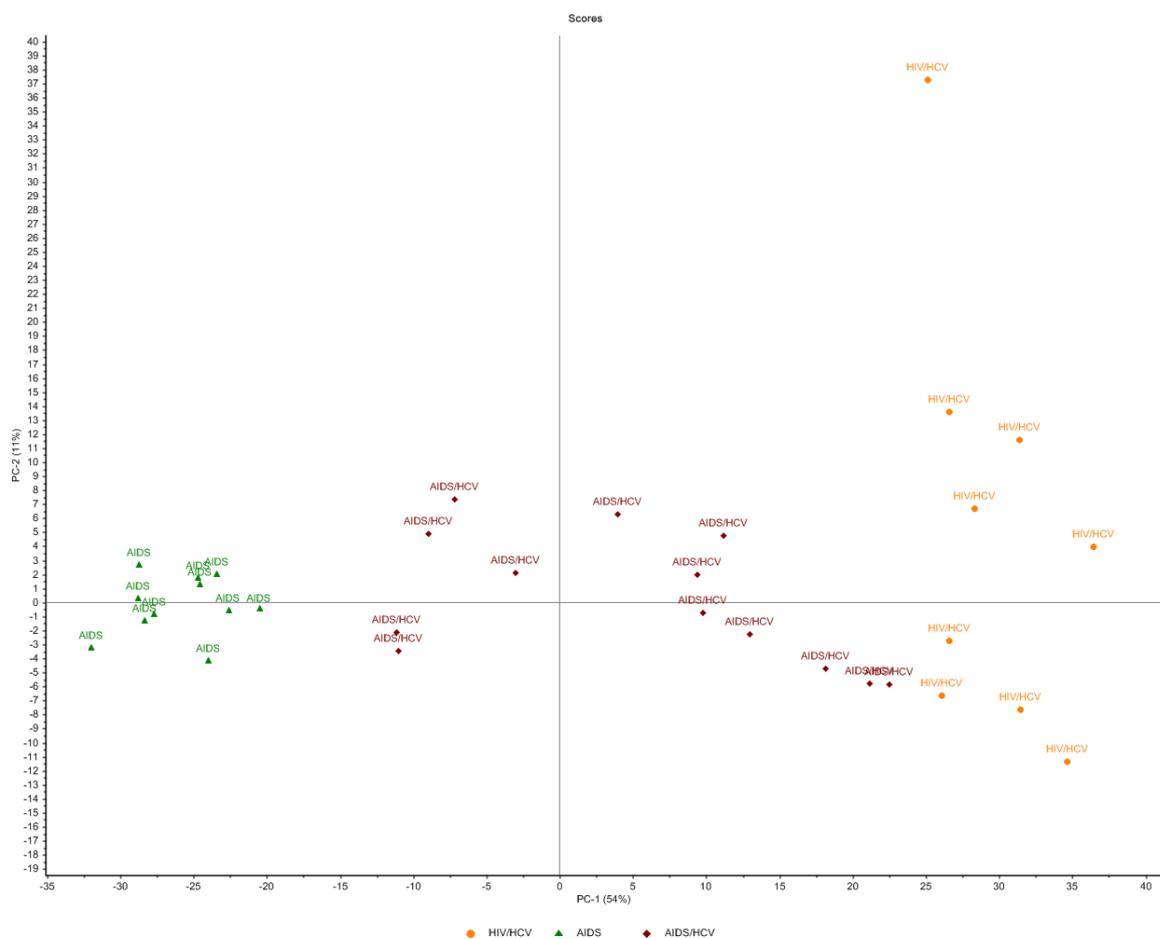


Figura 5.2.21. Scores obtenidos al aplicar el PCA en muestras de plasma procedentes de los pacientes estudiados (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC) sobre la primera y segunda componentes principales.

Posteriormente para abordar la selección de variables lipídicas con mayor poder discriminante que sirvieran de entrada para construir el modelo de clasificación se aplicó el algoritmo SELECT. Una vez obtenidas dichas variables se introdujeron en el método LDA. El modelo creado por la combinación de los algoritmos SELECT-LDA (Tabla 5.2.35) reveló una alta capacidad de discriminación al mostrar valores de clasificación del 92.84% para los pacientes con SIDA y porcentajes del 100% para los pacientes con VIH/VHC y SIDA/VHC, reflejando un rendimiento de clasificación total del 97.61%. Por otra parte, también se alcanzaron rendimientos de predicción interna muy altos, estando comprendidos entre un intervalo de valores de un 90.91 al 100%, reflejando una predicción total del 96.97%.

Tabla 5.2.35. Porcentajes de clasificación y predicción correspondientes al modelo LDA desarrollado para el enfoque de clasificación con tres categorías (pacientes con SIDA, pacientes con VIH/VHC y pacientes con SIDA/VHC).

Modelo SELECT-LDA	Clasificación (%)	Predicción (%)
Pacientes con SIDA	92.84	90.91
Pacientes con VIH/VHC	100	100
Pacientes con SIDA/VHC	100	100
Rendimiento total (TR)	97.61	96.97

En la Figura 5.2.22 se interpretan las diferencias de los scores que proporciona el LDA y que permiten observar la separación que se produce entre las diferentes categorías analizadas. En esta representación se muestran las diferencias de scores entre la primera y segunda variables canónicas frente a la diferencia entre los scores de la primera y tercera variables canónicas. Esta gráfica muestra de manera concisa que en el eje correspondiente a las “x” se logra la separación entre pacientes con SIDA respecto a los pacientes coinfectados (VIH/VHC y SIDA/VHC), mientras que el eje de las “y” define la separación de los pacientes con VIH/VHC con respecto a los pacientes que sufren SIDA y SIDA/VHC.

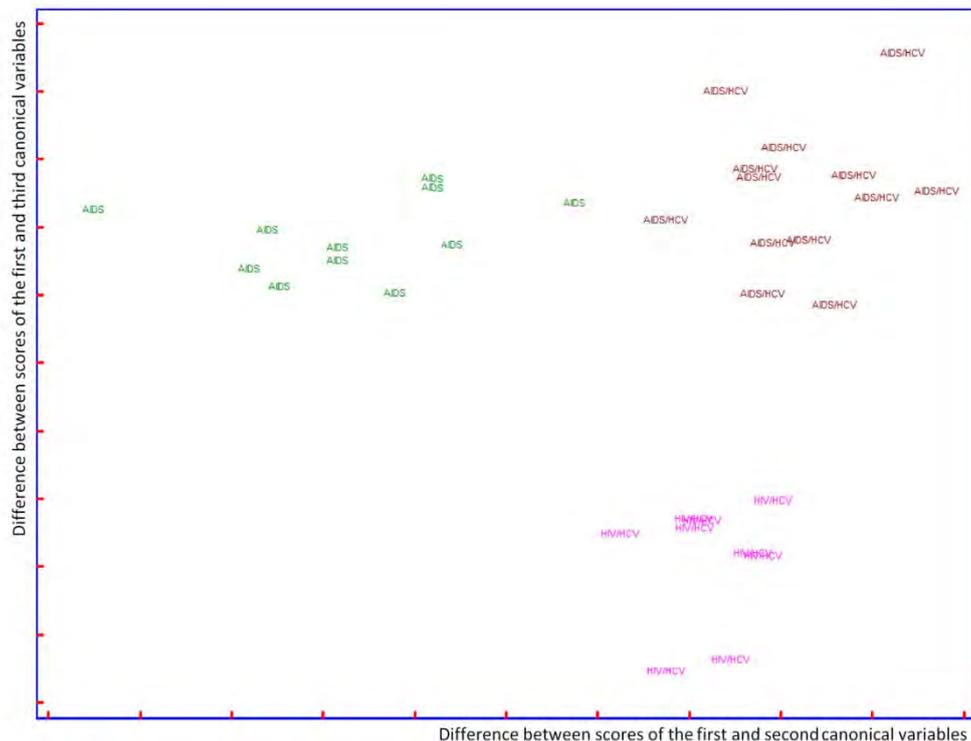


Figura 5.2.22. Representación de las diferencias entre los scores para la discriminación de muestras de plasma procedentes de pacientes con enfermedades avanzadas.

5.2.2.5.4. Análisis de las variables discriminantes como posibles biomarcadores

Los resultados obtenidos demostraron que la estrategia propuesta en ambos enfoques de clasificación es muy adecuada para modelar y predecir las enfermedades virológicas analizadas. Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos, se procedió a analizar las variables involucradas en los modelos de clasificación mediante técnicas de espectrometría de masas, MS/MS y MRM. De esta manera, se realizó la fragmentación de los iones para analizar los fragmentos generados en la célula de colisión, con el fin de obtener una identificación completa de los lípidos más discriminantes. Esta identificación permitió descubrir potenciales biomarcadores de las diferentes enfermedades.

La identificación de los compuestos a través de la m/z se efectuó basándose en una serie de reglas o características citadas a continuación: 1) en la exactitud de los valores de masa procedentes de la fase experimental con respecto a las asignaciones que aparecen en las distintas bases de datos, 2) en los aductos iónicos que podían formarse de manera apropiada de acuerdo con la familia lipídica a estudio, 3) en el tiempo de retención asociado a la elución de las distintas familia de lípidos, 4) y en la información proporcionada por los fragmentos de los iones detectados, ya que tales fragmentos eran conformados tras la pérdida de las cabezas de los diferentes grupos lipídicos y las escisiones descritas en bibliografía para cada compuesto. Esta información queda recogida en las Tablas 5.2.36 y 5.2.37, mostrando una descripción de los lípidos identificados para ambos modelos de clasificación incluyendo los valores de m/z , tiempo de retención, nomenclatura, fórmula y modo de ionización.

El modelo SELECT-QDA como se puede observar en la Tabla 5.2.36 fue construido a partir de once lípidos con alta capacidad discriminante. Tras la identificación de los lípidos de este modelo, se reveló que la discriminación entre pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control estaba marcada por tres familias lipídicas, siendo éstos compuestos: cuatro lípidos pertenecientes a la familia de los glicerofosfolípidos, seis lípidos correspondientes a la familia de los triglicéridos y, por último, un éster colesterol. En cambio, la construcción del modelo a través de los algoritmos SELECT-LDA para la discriminación entre pacientes con enfermedades avanzadas (SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC) se realizó a partir de diez lípidos (Tabla 5.2.37), pertenecientes a las siguientes familias: cuatro glicerofosfolípidos, dos triglicéridos, dos ésteres de colesterol, así como un ácido graso y un esfingolípido.

Tabla 5.2.36. Biomarcadores seleccionados para el modelo de clasificación SELECT-QDA.

Categoría	Sub-Categoría	Fórmula	Masa (Da)	t _r (min)	Nomenclatura	Ionización
Glicerofosfolípidos	PS	C ₃₈ H ₇₂ NO ₁₀ P	733.4893	6.49	PS(16:0/16:1)	[M-H] ⁺
	PC	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	805.5621	5.56	PC(16:0/22:6)	[M-H] ⁺
	PC	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	757.5621	5.91	PC(18:2/16:0)	[M-H] ⁺
	PC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759.57782	6.55	PC(16:0/18:1)	[M-H] ⁺
Triglicéridos	TG	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₆	882.7672	8.91	TG(18:1/18:2/18:1)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	858.7671	9.04	TG(16:0/18:1/18:1)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₅₁ H ₉₆ O ₆	804.7202	8.79	TG(16:0/16:0/16:1)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₄₉ H ₉₄ O ₆	778.7046	8.76	TG(14:0/16:0/16:0)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	878.7359	8.46	TG(16:0/18:2/20:4)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆	888.8141	9.46	TG(18:0/18:0/18:1)	[M-NH ₄] ⁺
Ésteres de colesterol	ChoE	C ₄₅ H ₇₆ O ₂	648.5845	9.31	ChoE(18:2)	[M-NH ₄] ⁺

Tabla 5.2.37. Biomarcadores seleccionados para el modelo de clasificación SELECT-LDA.

Categoría	Sub-Categoría	Fórmula	Masa (Da)	t _r (min)	Nomenclatura	Ionización
Glicerofosfolípidos	PC	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	781.5621	5.5	PC(16:0/20:4)	[M-H] ⁺
	PC	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	805.5621	5.56	PC(16:0/22:6)	[M-H] ⁺
	LPC	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	495.3325	1.65	PC(16:0/0:0)	[M-H] ⁺
	PI	C ₄₅ H ₈₃ O ₁₃ P	862.5571	4.7	PI(18:1/18:1)	[M-H] ⁻
Triglicéridos	TG	C ₅₁ H ₉₆ O ₆	804.7202	8.79	TG(16:0/16:0/16:1)	[M-NH ₄] ⁺
	TG	C ₅₃ H ₉₈ O ₆	830.7359	8.83	TG(16:0/16:1/18:1)	[M-NH ₄] ⁺
Ésteres de colesterol	ChoE	C ₄₅ H ₇₆ O ₂	648.5845	9.31	ChoE(18:2)	[M-NH ₄] ⁺
	ChoE	C ₄₇ H ₇₆ O ₂	672.5845	9.19	ChoE(20:4)	[M-NH ₄] ⁺
Ácidos grasos	FA	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.2402	2.64	FA(16:0)	[M-H] ⁻
Esfingolípidos	SM	C ₃₉ H ₈₀ N ₂ O ₆ P	703.5754	5.41	SM(d18:1/16:0)	[M-H] ⁺

5.2.2.5.5. Interpretación biológica de las familias lipídicas asociadas al VIH y VHC

Los biomarcadores que se han obtenido en este estudio son lípidos responsables de diferentes funciones biológicas, por ejemplo, los TGs proporcionan la principal fuente de energía de las células, mientras que los glicerofosfolípidos (PCs, PEs, PSs y fosfatidilinositol (PIs)), esfingolípidos y esteroides son los principales componentes de las membranas celulares [91].

Los tratamientos antirretrovirales utilizados para reducir la carga viral plasmática de los virus, VIH y VHC, son capaces de causar cambios drásticos en los lípidos, provocando la alteración del metabolismo lipídico del organismo infectado y desarrollando enfermedades como dislipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia... [92, 93].

Los datos experimentales obtenidos en este estudio mostraron el comportamiento que desarrollan los triglicéridos en la enfermedad, ya que los pacientes infectados por el VIH reflejan en los análisis un aumento de sus niveles en comparación con personas que nunca han sido infectadas por este virus [94]. Esta familia de lípidos, como ha sido estudiado en investigaciones previas, si se analiza con respecto a pacientes que sólo sufren Hepatitis C se puede observar que los niveles de triglicéridos son muy bajos durante la enfermedad, aumentando estos niveles una vez que la enfermedad ha transcurrido [95]. Sin embargo, cabe señalar que los niveles de estos lípidos siguen siendo muy altos si las personas son co-infectadas, ya que los niveles de TGs están controlados por la enfermedad del VIH, resultados que se corroboran en el grupo de pacientes analizados en este estudio [96].

En cuanto a las PCs, debe de observarse que este grupo de fosfolípidos está presente mayoritariamente en las membranas celulares, estando implicados activamente en la estructura y en el transporte de sustancias entre células y son capaces de alterar el metabolismo del colesterol y de los triglicéridos [97]. Una gran parte de los compuestos intermedios que están involucrados en la síntesis de las PCs se alteran durante la infección por el VIH y el VHC, ya que estos lípidos pueden ser utilizados por diversos receptores transmembrana para activar la transcripción del VIH. Estos resultados han sido descritos en estudios experimentales, los cuáles han demostrado que durante la replicación del VIH se incrementan los niveles de PCs en los monocitos infectados y los linfocitos T [98, 99]. Las observaciones efectuadas con respecto al nivel de las PCs en este estudio están en concordancia con las reflexiones obtenidas en investigaciones anteriores.

Por otra parte, ha sido seleccionado un biomarcador perteneciente a las diferentes familias (SM, FA, ChoE y PI), cuyas familias tienen en común que están involucradas en varias etapas de la replicación del virus o de la propia infección. Los FAs son utilizados por los virus del VIH y del VHC para realizar

tanto la comunicación molecular en cada paso de la replicación de los virus como para construir sus propias membranas. Estos compuestos tienen la capacidad de realizar ensamblajes y de penetrar en células humanas para lograr la propagación de la enfermedad [93, 100]. En cambio, las familias de ChoEs y SMs están directamente asociadas a la replicación del virus, mientras que los Pls actúan como compuestos intermedios en este proceso [91, 101-103].

Sin embargo, también han sido identificadas las LPCs como posibles biomarcadores, estando implicados estos lípidos en la prevención de la fusión de la membrana celular con las células víricas, por lo tanto evitando el ensamblaje del virión del VHC y VIH con las células humanas [104].

5.2.2.5.6. Potenciales biomarcadores lipídicos plasmáticos para el VIH y la co-infección con VHC

Para evaluar la discriminación entre pacientes con diferentes etapas de infección por VIH y VHC, se construyeron curvas ROC y se calcularon los AUC de los diferentes lípidos plasmáticos que habían sido seleccionados por su poder discriminante en la elaboración de los modelos de clasificación (Tabla 5.2.38 y 5.2.39).

Los compuestos con mayores valores de AUC presentan una mayor contribución en el poder discriminante entre los grupos estudiados (valores cercanos a 1 expresan una discriminación perfecta). Los resultados más altos para cada grupo están resaltados en las Tablas 5.2.38 y 5.2.39 y considerados como biomarcadores de diagnóstico para las enfermedades analizadas [105].

Si se analiza cada tipo de patología con respecto al conjunto completo de muestras se pueden obtener los biomarcadores que definen esa tipología concreta de manera genérica. Sin embargo, si cada grupo de pacientes se compara con otra patología se podrían obtener compuestos que discriminan entre las dos patologías enfrentadas y evaluadas, permitiendo conseguir los compuestos más significativos de cada etapa de la enfermedad, ya que el resto de los sujetos serían ignorados en la realización de estas asignaciones.

Basándose en el análisis de los resultados obtenidos en el modelo de clasificación tras aplicar los algoritmos SELECT-QDA (Tabla 5.2.38), se podrían obtener los biomarcadores más significativos para los pacientes que sufrían el VIH, pacientes con enfermedades avanzadas y sujetos control.

Tabla 5.2.38. Valores AUC para los lípidos que habían sido seleccionados por el modelo SELECT-QDA.

VIH	Pacientes con VIH con respecto al resto de pacientes analizados											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.7673	0.6748	0.7934	0.9335	0.6981	0.7568	0.6469	0.7269	0.7166	0.7385	0.6712
	Pacientes con VIH con respecto a sujetos control											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.8429	0.6286	0.7976	0.8986	0.8381	0.7214	0.9105	0.6357	0.9667	0.6976	0.6202
Control	Pacientes con VIH con respecto a pacientes con enfermedades avanzadas											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.7215	0.7027	0.6133	0.9668	0.8908	0.6522	0.7367	0.7821	0.8095	0.7633	0.7020
	Sujetos control con respecto al resto de pacientes analizados											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.6917	0.6740	0.7145	0.6472	0.7333	0.7889	0.8944	0.7481	0.9815	0.8511	0.7514
SIDA VIH/VHC SIDA/VHC	Sujetos control con respecto a pacientes con VIH											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.8429	0.6286	0.7976	0.8986	0.8381	0.7214	0.9105	0.6357	0.9667	0.6976	0.6202
	Sujetos control con respecto a pacientes con enfermedades avanzadas											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.5955	0.6333	0.8455	0.9061	0.6667	0.8318	0.9370	0.7121	0.9909	0.6504	0.6902
SIDA VIH/VHC SIDA/VHC	Pacientes con enfermedades avanzadas con respecto al resto de pacientes analizados											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.6731	0.6689	0.7007	0.9076	0.6233	0.7398	0.694	0.7480	0.8980	0.7081	0.6962
	Pacientes con enfermedades avanzadas con respecto a sujetos control											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
	AUC	0.5955	0.6333	0.8455	0.9061	0.6667	0.8318	0.9370	0.7121	0.9909	0.6504	0.6902
SIDA VIH/VHC SIDA/VHC	Pacientes con enfermedades avanzadas con respecto a pacientes con VIH											
	Compuesto	TG(46:0)	TG(52:2)	TG(54:4)	TG(48:1)	TG(54:1)	TG(54:6)	ChoE(18:2)	PC(34:1)	PC(34:2)	PC(38:6)	LPC(18:2)
AUC	0.7215	0.7027	0.6133	0.9668	0.8908	0.6522	0.7367	0.7821	0.8095	0.7633	0.7020	

Tabla 5.2.39. Valores AUC para los lípidos que habían sido seleccionados por el modelo SELECT-LDA.

VIH/VHC	Pacientes con VIH/VHC con respecto al resto de pacientes con enfermedades avanzadas										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.8333	0.9296	0.7037	0.6728	0.7315	0.9537	0.8380	0.7269	0.9167	0.6309
	Pacientes con VIH/VHC con respecto a pacientes con SIDA/VHC										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6923	0.8034	0.7847	0.6931	0.6239	0.9145	0.7265	0.6752	0.9462	0.7835
VIH/VHC	Pacientes con VIH/VHC con respecto a pacientes con SIDA										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6593	0.9697	0.8586	0.7752	0.9089	0.9438	0.8659	0.7879	0.8397	0.7071
	Pacientes con SIDA con respecto al resto de pacientes con enfermedades avanzadas										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.7727	0.8554	0.8760	0.8142	0.9231	0.9554	0.8017	0.7603	0.8471	0.7810
SIDA	Pacientes con SIDA con respecto a pacientes con SIDA/VHC										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6154	0.7762	0.8671	0.7381	0.9552	0.9294	0.6853	0.6275	0.7413	0.9722
	Pacientes con SIDA con respecto a pacientes con VIH/VHC										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6593	0.9697	0.8586	0.7752	0.9089	0.9438	0.8659	0.7879	0.8397	0.7071
SIDA/VHC	Pacientes con SIDA/VHC con respecto al resto de pacientes con enfermedades avanzadas										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.7549	0.6337	0.8308	0.7167	0.9346	0.6681	0.7944	0.7318	0.7547	0.9192
	Pacientes con SIDA/VHC con respecto a pacientes con SIDA										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6154	0.7762	0.8671	0.7381	0.9552	0.9294	0.6853	0.6275	0.7413	0.9722
SIDA/VHC	Pacientes con SIDA/VHC con respecto a pacientes con VIH/VHC										
	Compuesto	PI(36:2)	SM(34:1)	ChoE(20:4)	FA(16:0)	LPC(16:0)	TG(50:2)	PC(38:6)	TG(48:1)	PC(36:4)	ChoE(18:2)
	AUC	0.6923	0.8034	0.7847	0.6931	0.6239	0.9145	0.7265	0.6752	0.9462	0.7835

Para los pacientes infectados con VIH, el biomarcador genérico fue el TG(16:0/16:0/16:1) con un valor de m/z de 804.72. Además, cuando se evaluaron las AUC, se obtuvieron tres biomarcadores potenciales específicos entre pacientes con VIH y sujetos control, siendo éstos: un ChoE(18:2) con una m/z de 648.58, una PC(18:2/16:0) con una m/z de 757.56 y un TG(16:0/16:0/16:1) con una m/z de 804.72. De la misma manera, se obtuvieron los biomarcadores, TG(16:0/16:0/16:1) y TG(18:0/18:0/18:1) con valores de m/z de 804.72 Y 888.81 respectivamente, que discriminaban entre los pacientes con VIH y los pacientes que pertenecían al grupo de enfermedades avanzadas. Finalmente, se concluyó con los biomarcadores que permitieron discriminar entre el grupo control y los pacientes con enfermedades avanzadas, siendo éstos: un ChoE(18:2), una PC(18:2/16:0) y un TG(18:0/18:0/18:1) con valores de m/z de 648.58, 757.56 y 888.81, respectivamente.

Para la determinación de biomarcadores correspondientes a las patologías englobadas en el grupo de enfermedades avanzadas por VIH o co-infección con VHC, se tuvieron que analizar los resultados obtenidos en el modelo de clasificación elaborado tras la aplicación de los algoritmos SELECT-LDA (Tabla 5.2.39). A través de estos resultados fue posible determinar los biomarcadores genéricos para los pacientes con VIH/VHC con respecto al resto de pacientes analizados (SIDA y SIDA/VHC), siendo los biomarcadores seleccionados una SM(d18:1/16:0), una PC(16:0/20:4) y un TG(16:0/16:1/18:1) con las respectivas m/z : 703.58, 781.56 y 830.74. Cuando se comparó al grupo de pacientes con VIH/VHC con respecto al grupo de SIDA/VHC, fueron encontrados dos biomarcadores, correspondientes a una PC(16:0/20:4) con m/z 781.56 y a un TG(16:0/16:1/18:1) con m/z de 830.74. Por último, los grupos VIH/VHC y SIDA fueron diferenciados gracias a los compuestos: PC(16:0/0:0) correspondiéndole un valor de m/z de 495.33, una SM(d18:1/16:0) con una m/z de 703.58 y un TG(16:0/16:1/18:1) con un valor de m/z de 830.74. Para el grupo de pacientes con SIDA, los biomarcadores genéricos seleccionados fueron una PC(16:0/0:0) con una m/z de 495.33 y un TG(16:0/16:1/18:1) con un valor de m/z correspondiente a 830.74. Para finalizar este estudio, se determinaron los biomarcadores genéricos del grupo de pacientes con SIDA/VHC, los cuales fueron una PC(16:0/0:0) (m/z 495.33) y un ChoE(18:1) (m/z 668.63). Por otra parte, los biomarcadores que permitieron discriminar entre las patologías SIDA y SIDA/VHC fueron tres biomarcadores: PC(16:0/0:0) (m/z 495.33), TG(16:0/16:1/18:1) (m/z 830.74) y ChoE(18:1) (m/z 668.63).

5.2.2.6. Conclusiones

Los resultados obtenidos con la plataforma UPLC-MS, el análisis multivariado de los cromatogramas y el análisis de los lípidos discriminantes a través de las curvas ROC han permitido el descubrimiento de alteraciones lipídicas en pacientes con diferentes estadios de VIH y co-infectados con VHC.

Dentro de las familias lipídicas que mostraron mayor poder discriminante para diferenciar las distintas etapas de la enfermedad, destacaron los triglicéridos y las fosfatidilcolinas, ya que sufrieron fuertes cambios en sus concentraciones. Por esta razón, los biomarcadores claves de las enfermedades estudiadas son estas dos familias. Sin embargo, se requiere el uso de otras familias de lípidos que, de forma combinada, actúan como biomarcadores para definir más específicamente cada una de las enfermedades y las diferencias entre ellas.

Los resultados prometedores obtenidos en el presente estudio fomentan el uso del UPLC-MS como método que permite la obtención del perfilado completo de lípidos plasmáticos y a través de su análisis se consigue distinguir y diagnosticar entre los grupos de pacientes analizados (VIH, SIDA, VIH/VHC y SIDA/VHC). Sin embargo, se requieren más investigaciones para validar los cambios inducidos por estas enfermedades y aclarar el mecanismo de evolución del VIH al SIDA con o sin la infección por VHC. Por lo tanto, este estudio se debe considerar como una base prometedora para estudios futuros donde se incluyan y se analicen un mayor número de muestras.

Referencias

- [1] Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T.V., Shevchenko, A., Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*. (2008), 49, 1137-1146.
- [2] Vuckovic, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2012), 403, 1523-1548.
- [3] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. (1957), 226, 497-509.
- [4] Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (1959), 37, 911-917.
- [5] Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á.G., Zárata, R. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2008), 56, 4297-4303.
- [6] Hu, C., van Dommelen, J., van der Heijden, R., Spijksma, G., Reijmers, T.H., Wang, M., et al. RPLC-Ion-Trap-FTMS method for lipid profiling of plasma: Method validation and application to p53 mutant mouse model. *Journal of Proteome Research*. (2008), 7, 4982-4991.
- [7] Whiley, L., Godzien, J., Ruperez, F.J., Legido-Quigley, C., Barbas, C. In-Vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Analytical Chemistry*. (2012), 84, 5992-5999.
- [8] Hellmuth, C., Weber, M., Koletzko, B., Peissner, W. Nonesterified fatty acid determination for functional lipidomics: Comprehensive ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantitation, qualification, and parameter prediction. *Analytical Chemistry*. (2012), 84, 1483-1490.
- [9] Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F. *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier, Amsterdam (2006).
- [10] Mendiara, I., Domeño, C., Nerín, C. Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS. *Journal of Separation Science*. (2012), 35, 3308-3316.
- [11] Regueiro, J., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J.C., Cela, R. Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent

contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography. A.* (2008), 1190, 27-38.

[12] Tsochatzidis, N.A., Guiraud, P., Wilhelm, A.M., Delmas, H. Determination of velocity, size and concentration of ultrasonic cavitation bubbles by the phase-Doppler technique. *Chemical Engineering Science.* (2001), 56, 1831-1840.

[13] Gogate, P.R., Kabadi, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal.* (2009), 44, 60-72.

[14] Romdhane, M., Gourdon, C. Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal.* (2002), 87, 11-19.

[15] Byeon, S.K., Lee, J.Y., Moon, M.H. Optimized extraction of phospholipids and lysophospholipids for nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analyst.* (2012), 137, 451-458.

[16] Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. *Pharmaceutical experimental design.* Marcel Dekker, New York (1999).

[17] Yin, P., Peter, A., Franken, H., Zhao, X., Neukamm, S.S., Rosenbaum, L., et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clinical Chemistry.* (2013), 59, 833-845.

[18] Zivkovic, A.M., Wiest, M.M., Nguyen, U.T., Davis, R., Watkins, S.M., German, J.B. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics.* (2009), 5, 507-516.

[19] Ishikawa, M., Maekawa, K., Saito, K., Senoo, Y., Urata, M., Murayama, M., et al. Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age. *PLoS ONE.* (2014), 9, e91806.

[20] Comstock, G.W., Burke, A.E., Norkus, E.P., Gordon, G.B., Hoffman, S.C., Helzlsouer, K.J. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. *Clinical Chemistry.* (2001), 47, 139-142.

[21] Hsieh, S.Y., Chen, R.K., Pan, Y.H., Lee, H.L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics.* (2006), 6, 3189-3198.

[22] Pizarro, C., Arenzana-Rámila, I., Pérez-del-Notario, N., Pérez-Matute, P., González-Sáiz, J.-M. Plasma lipidomic profiling method based on ultrasound extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Chemistry.* (2013), 85, 12085-12092.

- [23] Luque de Castro, M.D., Delgado-Povedano, M.M. Ultrasound: A subexploited tool for sample preparation in metabolomics. *Analytica Chimica Acta*. (2014), 806, 74-84.
- [24] Cuhadar, S., Koseoglu, M., Atay, A., Dirican, A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochimica Medica*. (2013), 23, 70-77.
- [25] Bashir, S., Wiltshire, M., Cardigan, R., Thomas, S. Lipaemic plasma induces haemolysis in resuspended red cell concentrate. *Vox Sanguinis*. (2013), 104, 218-224.
- [26] Hawker, C.D., Roberts, W.L., DaSilva, A., Stam, G.D., Owen, W.E., Curtis, D., et al. Development and validation of an automated thawing and mixing workcell. *Clinical Chemistry*. (2007), 53, 2209-2211.
- [27] Von Heymann, C., Pruss, A., Sander, M., Finkeldey, A., Ziemer, S., Kalus, U., et al. Thawing procedures and the time course of clotting factor activity in fresh-frozen plasma: A controlled laboratory investigation. *Anesthesia and Analgesia*. (2006), 103, 969-974.
- [28] Miles, C.A., Morley, M.J., Rendell, M. High power ultrasonic thawing of frozen foods. *Journal of Food Engineering*. (1999), 39, 151-159.
- [29] Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Rodríguez-Tecedor, S., González-Sáiz, J.M. Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control*. (2013), 34, 158-167.
- [30] Lodish, H.F., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. *Molecular cell biology*. 4 th Ed. New York, W. H. Freeman and Company, (2000).
- [31] Cassol, E., Misra, V., Holman, A., Kamat, A., Morgello, S., Gabuzda, D. Plasma metabolomics identifies lipid abnormalities linked to markers of inflammation, microbial translocation, and hepatic function in HIV patients receiving protease inhibitors. *BMC Infectious Diseases*. (2013), 13, 203.
- [32] Cohen, S., Au, S., Pante, N. How viruses access the nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2011), 1813, 1634-1645.
- [33] Sanchez, E.L., Lagunoff, M. Viral activation of cellular metabolism. *Virology*. (2015), 479-480, 609-618.
- [34] Sitole, L., Steffens, F., Krüger, T.P.J., Meyer, D. Mid-ATR-FTIR Spectroscopic Profiling of HIV/AIDS Sera for Novel Systems Diagnostics in Global Health. *OMICS*. (2014), 18, 513-523.

- [35] Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M.J., Kaliszan, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2015), 113, 108-120.
- [36] Dunn, W.B., Ellis, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. (2005), 24, 285-294.
- [37] Trevisan, J., Angelov, P.P., Carmichael, P.L., Scott, A.D., Martin, F.L. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: Current practices to future perspectives. *Analyst*. (2012), 137, 3202-3215.
- [38] Ellis, D.I., Goodacre, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*. (2006), 131, 875-885.
- [39] Mitchell, A.L., Gajjar, K.B., Theophilou, G., Martin, F.L., Martin-Hirsch, P.L. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *Journal of Biophotonics*. (2014), 7, 153-165.
- [40] Owens, G.L., Gajjar, K., Trevisan, J., Fogarty, S.W., Taylor, S.E., Da Gama-Rose, B., et al. Vibrational biospectroscopy coupled with multivariate analysis extracts potentially diagnostic features in blood plasma/serum of ovarian cancer patients. *Journal of Biophotonics*. (2014), 7, 200-209.
- [41] Bahmani, M.K., Khosravi, A., Miri, R., Iwabu, Y., Ikuta, K., Sakudo, A. Spectroscopic characterization of human immunodeficiency virus type-1-infected plasma by principal component analysis and soft independent modeling of class analogy of visible and near-infrared spectra. *Molecular Medicine Reports*. (2009), 2, 805-809.
- [42] Sakudo, A., Suganuma, Y., Sakima, R., Ikuta, K. Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes. *Clinica Chimica Acta*. (2012), 413, 467-472.
- [43] Sakudo, A., Tsenkova, R., Onozuka, T., Morita, K., Li, S., Warachit, J., et al. A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiology and Immunology*. (2005), 49, 695-701.
- [44] Jolliffe, I. *Principal component analysis*. 2nd Ed. Springer-Verlag, New York (2002).
- [45] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte, Y., Kaufman, L. *Data handling in science and technology, in Chemometrics: a textbook, vol. 2*. Elsevier, Amsterdam (1988).

- [46] James, M. *Classification algorithms*. Collins Publishers, London (1985).
- [47] Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester, UK (2002).
- [48] Pizarro, C., Esteban-Diez, I., Saenz-Gonzalez, C., Gonzalez-Saiz, J.M. Vinegar classification based on feature extraction and selection from headspace solid-phase microextraction/gas chromatography volatile analyses: A feasibility study. *Analytica Chimica Acta*. (2008), 608, 38-47.
- [49] Forina, M., Lanteri, S., Casale, M., C. Oliveros, M.C. Stepwise orthogonalization of predictors in classification and regression techniques: An “old” technique revisited. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. (2007), 87, 252-261.
- [50] Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. *Introduction to infrared and raman spectroscopy (third edition)*. Academic Press, San Diego (1990).
- [51] Jackson, M., Wagnieres, G., Mantsch, H.H. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Academic Press, Oxford (2017).
- [52] Begin, M.E., Manku, M.S., Horrobin, D.F. Plasma fatty acid levels in patients with acquired immune deficiency syndrome and in controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. (1989), 37, 135-137.
- [53] Constans, J., Peuchant, E., Pellegrin, J.L., Sergeant, C., Hamon, C., Dubourg, L., et al. Fatty acids and plasma antioxidants in HIV-positive patients: Correlation with nutritional and immunological status. *Clinical Biochemistry*. (1995), 28, 421-426.
- [54] Drelichowska, J., Kwiatkowska, W., Knysz, B., Witkiewicz, W. Metabolic syndrome in HIV-positive patients. *HIV & AIDS Review*. (2015), 14, 35-41.
- [55] Dubé, M.P., Stein, J.H., Aberg, J.A., Fichtenbaum, C.J., Gerber, J.G., Tashima, K.T., et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: Recommendations of the HIV medicine association of the infectious disease society of America and the adult AIDS clinical trials group. *Clinical Infectious Diseases*. (2003), 37, 613-627.
- [56] Grunfeld, C., Pang, M., Doerrler, W., Shigenaga, J.K., Jensen, P., Feingold, K.R. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. (1992), 74, 1045-1052.
- [57] Woods, M.N., Wanke, C.A., Ling, P.R., Hendricks, K.M., Tang, A.M., Andersson, C.E., et al. Metabolic syndrome and serum fatty acid patterns in

serum phospholipids in hypertriglyceridemic persons with human immunodeficiency virus. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2009), 89, 1180-1187.

[58] Grunfeld, C., Feingold, K.R. Regulation of lipid metabolism by cytokines during host defense. *Nutrition*. (1996), 12, S24-S26.

[59] Shearer, G.M., Clerici, M., Lucey, D.R. Cytokines and HIV infection. *Seminars in Virology*. (1994), 5, 449-455.

[60] Jahoor, F., Gazzard, B., Phillips, G., Sharpstone, D., Delrosario, M., Frazer, M.E., et al. The acute-phase protein response to human immunodeficiency virus infection in human subjects. *The American Journal of Physiology*. (1999), 276, 1092-1098.

[61] Lau, B., Sharrett, A.R., Kingsley, L.A., Post, W., Palella, F.J., Visscher, B., et al. C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Archives of Internal Medicine*. (2006), 166, 64-70.

[62] Dubé, M.P. Disorders of glucose metabolism in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*. (2000), 31, 1467-1475.

[63] Gutierrez, A.D., Balasubramanyam, A. Dysregulation of glucose metabolism in HIV patients: epidemiology, mechanisms, and management. *Endocrine*. (2012), 41, 1-10.

[64] Willig, A.L., Overton, E.T. Metabolic consequences of HIV: Pathogenic insights. *Current HIV/AIDS Reports*. (2014), 11, 35-44.

[65] Vassallo, M., Mercié, P., Cottalorda, J., Ticchioni, M., Dellamonica, P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: A systematic literature review. *Virology Journal*. (2012), 9, 174.

[66] Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., Kingsley, L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. (1996), 272, 1167-1170.

[67] Reingold, J.S., Wanke, C., Kotler, D.P., Lewis, C.E., Tracy, R., Heymsfield, S., et al. Association of HIV infection and HIV/HCV coinfection with C-reactive protein levels: The fat redistribution and metabolic change in HIV infection (FRAM) study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. (2008), 48, 142-148.

[68] Butt, A.A., McGinnis, K., Rodriguez-Barradas, M.C., Crystal, S., Simberkoff, M., Goetz, M.B., et al. HIV infection and the risk of diabetes mellitus. *AIDS*. (2009), 23, 1227-1234.

- [69] Rodriguez-Guardado, A., Maradona, J.A., Asensi, V., Cartón, J.A., Casado, L. Hepatitis C virus in patients with HIV infection and lipodystrophy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. (2003), 32, 348-349.
- [70] Operskalski, E.A., Kovacs, A. HIV/HCV co-infection: Pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. *Current HIV/AIDS Reports*. (2011), 8, 12-22.
- [71] Berger, A., Prondzinski, M.D., Doerr, H.W., Rabenau, H., Weber, B. Hepatitis C plasma viral load is associated with HCV genotype but not with HIV coinfection. *Journal of Medical Virology*. (1996), 48, 339-343.
- [72] Bertozzi, S., Padian, N.S., Wegbreit, J., DeMaria, L.M., Feldman, B., Gayle, H., et al. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd Ed. Jamison, D. T.; Breman, J. G.; Measham, A. R. Ed.; Oxford University Press and The World Bank: Washington, DC (2006).
- [73] Lorizate, M., Kräusslich, H.G. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. (2011), 3.
- [74] Nguyen, D.H., Taub, D.D. Targeting lipids to prevent HIV infection. *Molecular Interventions*. (2004), 4, 318-320.
- [75] Hadigan, C., Meigs, J.B., Corcoran, C., Rietschel, P., Piecuch, S., Basgoz, N., et al. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clinical Infectious Diseases*. (2001), 32, 130-139.
- [76] Hartler, J., Tharakan, R., Kofeler, H.C., Graham, D.R., Thallinger, G.G. Bioinformatics tools and challenges in structural analysis of lipidomics MS/MS data. *Briefings in Bioinformatics*. (2013), 14, 375-390.
- [77] Hu, C., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., Xu, G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography. B*. (2009), 877, 2836-2846.
- [78] Checa, A., Bedia, C., Jaumot, J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Analytica Chimica Acta*. (2015), 885, 1-16.
- [79] Teo, C.C., Chong, W.P.K., Tan, E., Basri, N.B., Low, Z.J., Ho, Y.S. Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. (2015), 66, 1-18.
- [80] Yetukuri, L., Katajamaa, M., Medina-Gomez, G., Seppänen-Laakso, T., Vidal-Puig, A., Orešič, M. Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: Characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Systems Biology*. (2007), 1, 12-26.

- [81] Kostara, C.E., Papathanasiou, A., Psychogios, N., Cung, M.T., Elisaf, M.S., Goudevenos, J., et al. NMR-based lipidomic analysis of blood lipoproteins differentiates the progression of coronary heart disease. *Journal of Proteome Research*. (2014), 13, 2585-2598.
- [82] Rainville, P.D., Stumpf, C.L., Shockcor, J.P., Plumb, R.S., Nicholson, J.K. Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics. *Journal of Proteome Research*. (2007), 6, 552-558.
- [83] Winnike, J.H., Wei, X., Knagge, K.J., Colman, S.D., Gregory, S.G., Zhang, X. Comparison of GC-MS and GCxGC-MS in the analysis of human serum samples for biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*. (2015), 14, 1810-1817.
- [84] Cajka, T., Fiehn, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. (2014), 61, 192-206.
- [85] Castro-Perez, J.M., Kamphorst, J., DeGroot, J., Lafeber, F., Goshawk, J., Yu, K., et al. Comprehensive LC-MSE lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. *Journal of Proteome Research*. (2010), 9, 2377-2389.
- [86] Madsen, R., Lundstedt, T., Trygg, J. Chemometrics in metabolomics -- A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. (2010), 659, 23-33.
- [87] Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. (2009), 50, S9-S14.
- [88] Du, F., Virtue, A., Wang, H., Yang, X.-F. Metabolomic analyses for atherosclerosis, diabetes, and obesity. *Biomarker Research*. (2013), 1, 1-17.
- [89] Forina, M., Leardi, R., Armanino, C., Lanteri, S., Conti, P., Princi, P. *PARVUS: An extendable package of programs for data exploration, classification and correlation*. Elsevier Scientific Software, Amsterdam (1988).
- [90] Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., et al. pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. (2011), 12, 1-8.
- [91] Waheed, A.A., Freed, E.O. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Research*. (2009), 143, 162-176.
- [92] Gillard, B.K., Raya, J.L., Ruiz-Esponda, R., Iyer, D., Coraza, I., Balasubramanyam, A., et al. Impaired lipoprotein processing in HIV patients on antiretroviral therapy: Aberrant high-density lipoprotein lipids, stability, and

function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (2013), 33, 1714-1721.

[93] Rasheed, S., Yan, J.S., Lau, A., Chan, A.S. HIV replication enhances production of free fatty acids, low density lipoproteins and many key proteins involved in lipid metabolism: A proteomics study. *PLoS ONE*. (2008), 3, e3003.

[94] Heath, K.V., Hogg, R.S., Chan, K.J., Harris, M., Montessori, V., O'Shaughnessy, M.V., et al. Lipodystrophy-associated morphological, cholesterol and triglyceride abnormalities in a population-based HIV/AIDS treatment database. *AIDS*. (2001), 15, 231-239.

[95] Dai, C.Y., Huang, J.F., Hsieh, M.Y., Lee, L.P., Hou, N.J., Yu, M.L., et al. Links between triglyceride levels, hepatitis C virus infection and diabetes. *Gut*. (2007), 56, 1167-1168.

[96] Patroni, A., Torti, C., Tomasoni, L., Quiros Roldan, E., Bertelli, D., Puoti, M., et al. Effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) and hepatitis C co-infection on hyperlipidemia in HIV-infected patients: A retrospective longitudinal study. *HIV Clinical Trials*. (2002), 3, 451-461.

[97] Hexsel, D., Serra, M., Mazzuco, R., Dal'Forno, T., Zechmeister, D. Phosphatidylcholine in the treatment of localized fat. *Journal of Drugs in Dermatology* (2003), 2, 511-518.

[98] Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacque, J.M., Thomas, D., Diaz-Meco, M.T., et al. Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *Journal of Virology*. (1993), 67, 6596-6604.

[99] Roe, B., Kensicki, E., Mohny, R., Hall, W.W. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes. *PLoS ONE*. (2011), 6, e23641.

[100] Kapadia, S.B., Chisari, F.V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2005), 102, 2561-2566.

[101] Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., et al. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. (2008), 82, 5715-5724.

[102] Bishé, B., Syed, G., Siddiqui, A. Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses*. (2012), 4, 2340-2358.

[103] Rose, H., Hoy, J., Woolley, I., Tchoua, U., Bukrinsky, M., Dart, A., et al. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. (2008), 199, 79-86.

[104] Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M., Cohen, F.S. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *The Journal of Cell Biology*. (2000), 151, 413-423.

[105] Xie, G., Lu, L., Qiu, Y., Ni, Q., Zhang, W., Gao, Y.T., et al. Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer. *Journal of Proteome Research*. (2015), 14, 1195-1202.

CHAPTER 6

Conclusions



This chapter contains the general conclusions of this thesis. More detailed conclusions are included in Results and Discussion chapter that precede this one.

- In order to obtain reliable information from on a biological sample in a clinical analysis, both the thawing process and lipid extraction phase are as critical as the analysis itself to obtain reliable results that are adjusted to reality.
- Lipid extraction assisted with ultrasonic energy and MTBE affords a significant improvement over the standard methods of extraction employed in clinical laboratories. When comparing the results obtained using the standard protocols and this novel method, the new method provided both significantly higher levels of lipid recovery as well as the separation of a higher number of lipids.
- Lipid extraction with MTBE-US has been shown to be more effective than lipid extraction with DCM and MTBE-Vortex because it requires less time to perform this process.
- The in-depth analysis carried out (based on experimental design and response surface methodologies) on the MTBE-US lipid extraction procedure afforded defining the optimum condition of each factor for general extraction and specific conditions for extracting each lipid family.
- The combination of experimental design methodologies and response surfaces allowed us to identify the three most relevant factors in the thawing processes of plasma samples that affect the lipid profile: temperature, sample volume and thawing methodology. The optimum conditions correspond to 4°C, 0.25 mL of human plasma and ultrasound assisted thawing.
Besides, this study yielded a well-defined protocol for obtaining reproducible results and reducing the presence of false biomarkers in lipid investigations.
- The design of a two-approach classification methodology, based on selecting the most discriminating spectroscopic markers from FT-IR spectra, has allowed to diagnose or distinguish amongst control subjects and patients in both HIV-seropositive and AIDS with presence or absence of HCV co-infection.
- Liquid chromatography coupled to mass spectrometry has been successfully used to discriminate between HIV-positive patients with presence or absence of HCV infection and control subjects. This result was successfully achieved by the analysis of chromatographic fingerprints and the subsequent development of classification models

based on a reduced number of biological markers and treated as possible biomarkers of these diseases.

Finally, the results obtained in the experiments leading to this thesis are especially relevant considering that a thawing and extraction protocol that improves the recovery of lipids for clinical analysis have been developed. On the other hand, we would like to draw attention to the use of the proposed multivariate analysis strategies, as tools for both the diagnosis and the discovery of biomarkers of the diseases analysed.

CAPÍTULO 6

Conclusiones



Este último capítulo recoge las conclusiones generales de la presente tesis. En el capítulo predecesor a éste, Resultados y Discusión, son detalladas con más profundidad las conclusiones que se han obtenido en cada estudio realizado.

- Con el fin de obtener información fiable a partir de una muestra biológica en un análisis clínico, se deben de considerar los procesos de descongelación y la fase de extracción de lípidos tan críticos como el propio análisis, ya que se deben obtener unos resultados que se ajusten a la realidad.
- La extracción de lípidos asistida con energía ultrasónica y MTBE proporciona una mejora significativa con respecto a los métodos estándar de extracción empleados en los laboratorios clínicos. Al comparar los resultados obtenidos utilizando los protocolos estándar y este novedoso método, se pudo observar la mejora obtenida tanto en niveles de recuperación de lípidos como en el número de lípidos detectados.
- Se ha demostrado que la extracción de lípidos con MTBE-US es más eficaz que la extracción lipídica realizada con DCM y MTBE-Vortex, ya que necesita un menor tiempo para la realización de este proceso.
- El análisis en profundidad llevado a cabo (en base a metodologías de diseño de experimentos y superficies de respuestas) sobre el procedimiento de extracción de lípidos asistido por MTBE-US permitió definir la condición óptima de cada uno de los factores para la realización de una extracción general y las condiciones específicas para extraer cada una de las familias lipídicas.
- La combinación de metodologías de diseño de experimentos y superficies de respuestas nos permitió identificar los tres factores más relevantes en los procesos de descongelación de muestras plasmáticas que afectan al perfil lipídico: temperatura, volumen de la muestra y la metodología empleada para realizar la descongelación. Las óptimas condiciones se consiguieron a 4°C, 0.25 mL de plasma humano y como método la descongelación asistida por ultrasonidos. Además, este trabajo de investigación proporcionó un protocolo bien definido para obtener resultados reproducibles y reducir la presencia de falsos biomarcadores en las investigaciones lipídicas.
- El diseño de una metodología de clasificación con dos enfoques, basada en la selección de marcadores espectroscópicos (variables FT-IR) con alto poder discriminante, ha permitido diagnosticar o discriminar entre sujetos control y pacientes seropositivos en VIH o SIDA, pudiendo estar co-infectados con el VHC.

- La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se ha empleado exitosamente en la discriminación de pacientes con VIH, pacientes con enfermedades avanzadas (SIDA, SIDA/VHC y VIH/VHC) y sujetos control. Este resultado se alcanzó por medio del análisis de huellas cromatográficas y la construcción de modelos de clasificación basados en un reducido número de marcadores biológicos que son tratados como posibles biomarcadores de estas enfermedades.

Finalmente, los resultados obtenidos en los experimentos durante esta tesis doctoral cobra especial relevancia teniendo en cuenta que se ha abordado un protocolo de descongelación y un método de extracción permitiendo una mejora en la recuperación lipídica para los análisis clínicos. Por otro lado, destacar el empleo de las estrategias de análisis multivariado propuestas, ya que se pueden convertir en excelentes herramientas tanto para el diagnóstico como para el descubrimiento de biomarcadores de las enfermedades analizadas.