

Estudio comparado de dos métodos de desproteínización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética

Eloy Daniel Álvarez-Guerra,*** Harold G. Parkes,*** Jimmy D. Bell**

RESUMEN

A pesar de la reconocida utilidad de la espectroscopia de resonancia magnética (ERM), diversos factores han contribuido a la escasa difusión en el ámbito clínico: i) la gran complejidad instrumental y experimental en la interpretación bioquímica de las mediciones y ii) la ausencia de sistemas automatizados que proporcionen información confiable y adecuada. En este trabajo se cuantificaron un conjunto de metabolitos procedentes de espectros protónicos de resonancia magnética a partir de extractos de sangre total y plasma preparados por precipitación con acetonitrilo y ácido perclórico. Se evaluó la utilidad de ambos métodos de desproteínización para su aplicación en un futuro estudio combinado por ERM y reconocimiento de patrones. Los resultados demostraron que tanto la precipitación en acetonitrilo como la precipitación en ácido perclórico producen espectros con una gran cantidad de señales provenientes de diversos metabolitos, sin embargo, el acetonitrilo es un solvente más selectivo y su uso puede ayudar a simplificar el espectro y proveer al mismo tiempo suficiente información para la automatización de procedimientos de clasificación basados en la información de la espectroscopia de resonancia magnética.

Palabras clave: Espectroscopia de resonancia magnética, ERM, análisis de componentes, patrón de reconocimiento, métodos de desproteínización, sangre total, plasma.

ABSTRACT

Even though magnetic resonance spectroscopy is a very useful method in biological research, different issues have contributed to its minor diffusion in the clinical environment: i) high instrumental and experimental complexity, as well as, in the biochemical interpretation of measurements and ii) lack of automatized system providing reliable and accurate information. In this work, a number of metabolites from proton magnetic resonance spectrum extracts of whole blood and plasma previously prepared by acetonitrile and perchloric acid precipitation were obtained. Usefulness of both deproteinization methods, to be used in the future in a combined study using magnetic resonance and pattern recognition techniques, was assessed. Results demonstrated that both methods (perchloric acid and acetonitrile precipitation) produce good spectra including a lot of metabolites; however, acetonitrile is a more selective solvent providing an alternative method for spectra simplification while supplying enough information for the development of automatized classification methods via magnetic resonance information.

Key words: Magnetic resonance spectroscopy, MRS, principal components analysis, PCA, pattern recognition, steady-state, deproteinization methods, blood, plasma.

* Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500, Cuba.

** MRI Unit, MRC Clinical Sciences Centre, Hammersmith Hospital, Imperial College, Du Cane Road, London W12 0HS, UK.

*** Department of Medical Physics, University College London, 12 Queen Square, London WC1N 3AR, and Radiology and Physics Unit, Institute of Child Health, University College London, 30 Guilford street, London WC1N 1EH, UK.

Correspondencia:

Dr. Eloy Daniel Álvarez-Guerra. Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500, Cuba. e-mail: eloydaniel@yahoo.co.uk

Patrocinador: The British Council and the Medical Research Council (UK).

Recibido: 14-10-2005

Aceptado: 11-06-2006

INTRODUCCIÓN

A pesar de la reconocida utilidad de la espectroscopia de resonancia magnética (ERM) en fluidos biológicos y tejidos para el diagnóstico y evolución de enfermedades,¹⁻⁴ existen pocos ejemplos de aplicación rutinaria en el ámbito clínico. Diversos factores han contribuido a esta escasa difusión: i) la gran complejidad instrumental y experimental en la interpretación bioquímica de las mediciones y ii) la ausencia de sistemas automatizados que proporcionen información confiable y adecuada al entorno clínico. El espectro protónico de fluidos biológicos y tejidos es un caso donde se presenta una gran cantidad de señales solapadas, procedentes de cientos de metabolitos diferentes, muchas veces distorsionadas por la influencia de lípidos y proteínas; efecto mucho más evidente cuando se utilizan fluidos biológicos no procesados previamente como es el caso de la sangre total o el plasma. Diversos métodos de precipitación han sido empleados en ERM como una forma de simplificar el espectro al eliminar el efecto contraproducente de las macromoléculas.⁵

En los últimos años, se aprecia un creciente interés por aplicar herramientas del reconocimiento de patrones y la inteligencia artificial al estudio de espectros de resonancia magnética en un intento por desarrollar aplicaciones clínicas automatizadas;^{3,4,6-8} sin embargo, estos trabajos se han concentrado, fundamentalmente, en las aplicaciones oncológicas del sistema nervioso central y por otra parte en el denominado enfoque metabonómico definido como la respuesta dinámica multiparamétrica de los sistemas vivos frente a la acción de agentes xenobióticos (tóxicos exógenos) o de modificaciones genéticas, a partir del cual se han desarrollado diversos modelos para el análisis y clasificación de agentes tóxicos en los sistemas vivos.⁹ Un aspecto imprescindible para aplicar estos métodos es disponer de información bioquímica confiable y robusta. La ERM es uno de los métodos por excelencia para suministrar ese tipo de información pero es necesario disminuir la influencia de variaciones experimentales que modifiquen el patrón metabólico en el reconocimiento de patrones.

La gran variabilidad que existe en el cuadro clínico de los individuos afectados con anemia de hemáties falciformes hace necesaria una caracterización objetiva del estado del enfermo y los enfoques basados en la ERM pueden suministrar información metabólica que permita profundizar en las causas de las variaciones individuales. Para ello es necesario estandarizar métodos de ERM que, a su vez, apliquen

los novedosos enfoques de la metabonómica y la metabolómica (esta última definida como la determinación del complemento metabólico de una célula). El primer paso hacia la obtención de estos métodos es la validación de técnicas apropiadas de pre-procesamiento de espectros de resonancia magnética nuclear donde la precipitación de proteínas tiene una importancia particular como fuente de variación entre los espectros.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de diferentes métodos de precipitación (acetónitrilo y ácido perclórico) para el análisis de extractos de sangre total y plasma mediante un conjunto de experimentos que pudieran verificar la magnitud de la variación entre muestras y métodos de desproteínización (variabilidad intra-métodos e inter-métodos) y validar de esta forma su utilidad en el pre-procesamiento de este tipo de fluido biológico para el estudio combinado de ERM y reconocimiento de patrones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos y muestras: Entre 10 y 20 mL de la sangre de 12 individuos voluntarios sanos se extrajo directamente en tubos vacutainer (BD Vacutainer Microsystem, Reino Unido) por venopunción para realizar el análisis cualitativo de los espectros. Se utilizó inmediatamente 1 mL de sangre total para la precipitación orgánica. El plasma fue obtenido por métodos estándares mediante la centrifugación de 10 mL de sangre total a 1,500 rpm a 4°C. El plasma restante se congeló para usos futuros. Los individuos escogidos fueron de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20-45 años y con patrones étnicos similares.

Cuantificación intra-método e inter-métodos: En este estudio se compararon dos métodos de precipitación; i) la precipitación en acetónitrilo y ii) la precipitación en una solución al 12% de ácido perclórico. El diseño se dividió en dos ensayos, en el primero se utilizaron muestras tomadas de un mismo individuo para determinar el efecto del método de precipitación; a este ensayo se le denominó comparación inter-método. En el segundo, se utilizaron muestras provenientes de un mismo individuo para evaluar el efecto de la precipitación en el tipo de muestra empleado (plasma y sangre total), este estudio fue denominado comparación intra-método. En el estudio se analizaron muestras provenientes de dos individuos voluntarios sanos masculinos con edades comprendidas entre 30-45 años. Para reducir la variación biológica, en el estudio intra-método se compararon 5 muestras de san-

gre y 5 muestras de plasma precipitadas con cada uno de los métodos de desproteinización procedentes de un mismo individuo. En el estudio inter-método las 10 muestras de sangre fueron obtenidas de un individuo y las 10 de plasma de otro individuo. Los 10 mL de sangre procedente de un individuo se dividieron en alícuotas de 1 mL y se añadieron a 2 mL de la fase para precipitación. Otros 20 mL se centrifugaron a 1,500 rpm a 4°C para obtener el plasma. De los 10 mL de plasma obtenidos se tomaron alícuotas de 1 mL a los que se añadieron a 2 mL de la fase para precipitación.

Métodos de precipitación de macromoléculas: Los metabolitos de bajo peso molecular de la sangre se extrajeron usando acetonitrilo (al 100%) y ácido perclórico (al 12%). Las extracciones se efectuaron como se describe en la literatura.⁵ En resumen, 1 mL de sangre o plasma se añadió, inmediatamente después de la extracción por venopunción, a 2 mL de ácido perclórico (método 1) y a 2 mL de acetonitrilo (método 2), (2:1, v/v).

Extracción con ácido perclórico: Las soluciones se agitaron y dejaron en reposo por 15 minutos. Más tarde se centrifugaron a 2,500 rpm por 10 minutos a 4°C. Los extractos en ácido perclórico se neutralizaron a pH 7.2 con KOH 1N y se liofilizaron durante 24 horas hasta obtener el residuo sólido.

Extracción con acetonitrilo: Las soluciones se agitaron y dejaron en reposo por 15 minutos. Más tarde se centrifugaron a 2,500 rpm por 10 minutos a 4°C. Los extractos en acetonitrilo se evaporaron en atmósfera de nitrógeno gaseoso hasta obtener el residuo sólido.

Tanto los extractos obtenidos de la precipitación con ácido perclórico como los obtenidos de la precipitación con acetonitrilo se resuspendieron en 1 mL de óxido de deuterio (Sigma-Aldrich, USA) y se les adicionó 10 µL de una solución 3 mM de 3-(Trimetilsilil) 2,2,3,3-tetradeuteriopropionato (TSP) (Sigma-Aldrich, USA) como referencia interna y estándar para la cuantificación.

Muestras reconstituidas: Se prepararon dos muestras artificiales constituidas por los compuestos valina, lactato y glucosa de la siguiente manera: i) la muestra A estuvo constituida por 10 mL de una solución de valina 5 mM, lactato 5 mM y glucosa 5 mM, ii) para la muestra B se prepararon 10 mL de una solución conteniendo valina 2.5 mM, lactato 2.5 mM y glucosa 2.5 mM. Éstas se procesaron de idéntica manera a las muestras de sangre y plasma y se obtuvieron los espectros en idénticas condiciones.

Sistema de RMN: Los extractos se midieron en un espectrómetro Unity Plus (Varian, Palo Alto, Ca) a

500 MHz. Los espectros se obtuvieron con la secuencia estándar para un tiempo total de 6.5s. Se utilizó un pulso de 45°, 6 Hz de ancho de banda y 32K-puntos. Todas las muestras se midieron a 25°C. La pre-saturación de la línea del agua se logró con una atenuación de 25 dB. Se adquirieron 256 acumulaciones promediadas para cada muestra. El análisis y la cuantificación de los datos se efectuaron utilizando el software SpecNMR (Jeol, Welwyn Garden City, UK). Las asignaciones de los picos correspondientes a cada metabolito se efectuaron por comparación de las señales equivalentes a los metabolitos asignados en la literatura,¹⁰ por estudios de correlación ¹H-¹H y por comparación con los espectros reconstituidos. De esta forma se identificaron las señales de los metabolitos valina, 3-hidroxibutirato, lactato, alanina, acetato, creatina y glucosa. Los valores de la concentración molar fueron obtenidos a partir de la integración de cada señal en relación a la concentración del estándar interno (TSP). En el estudio de comparación intra-métodos los valores de concentración fueron corregidos para el efecto de dilución producido en la sangre como resultado del hematócrito (multiplicando el valor de concentración molar por un factor de 1.56 correspondiente a un hematócrito del 46%). De esta forma se pudo comparar, para cada método por separado, la sangre total y el plasma.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva (media ± desviación estándar [DE]) y t de Student como prueba de comparación, las cuales fueron calculadas con el programa Matlab 7.0 (The MathWorks, Inc, Natick, Massachusetts). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El análisis cualitativo demostró que los espectros eran reproducibles, tenían buena relación señal/ruido y una gran complejidad por la existencia de incontables señales. No fue posible diferenciar a simple vista los espectros obtenidos con un método de desproteinización o el otro. Fue necesario, por consiguiente, efectuar un estudio cuantitativo. La *figura 1* muestra los espectros característicos de ambos métodos y muestras. En la comparación intra-método, no se apreciaron, a simple vista, diferencias cualitativas entre los espectros procedentes de extractos en acetonitrilo de sangre total (a) y plasma (b), sin embargo, se observaron diferencias cualitativas

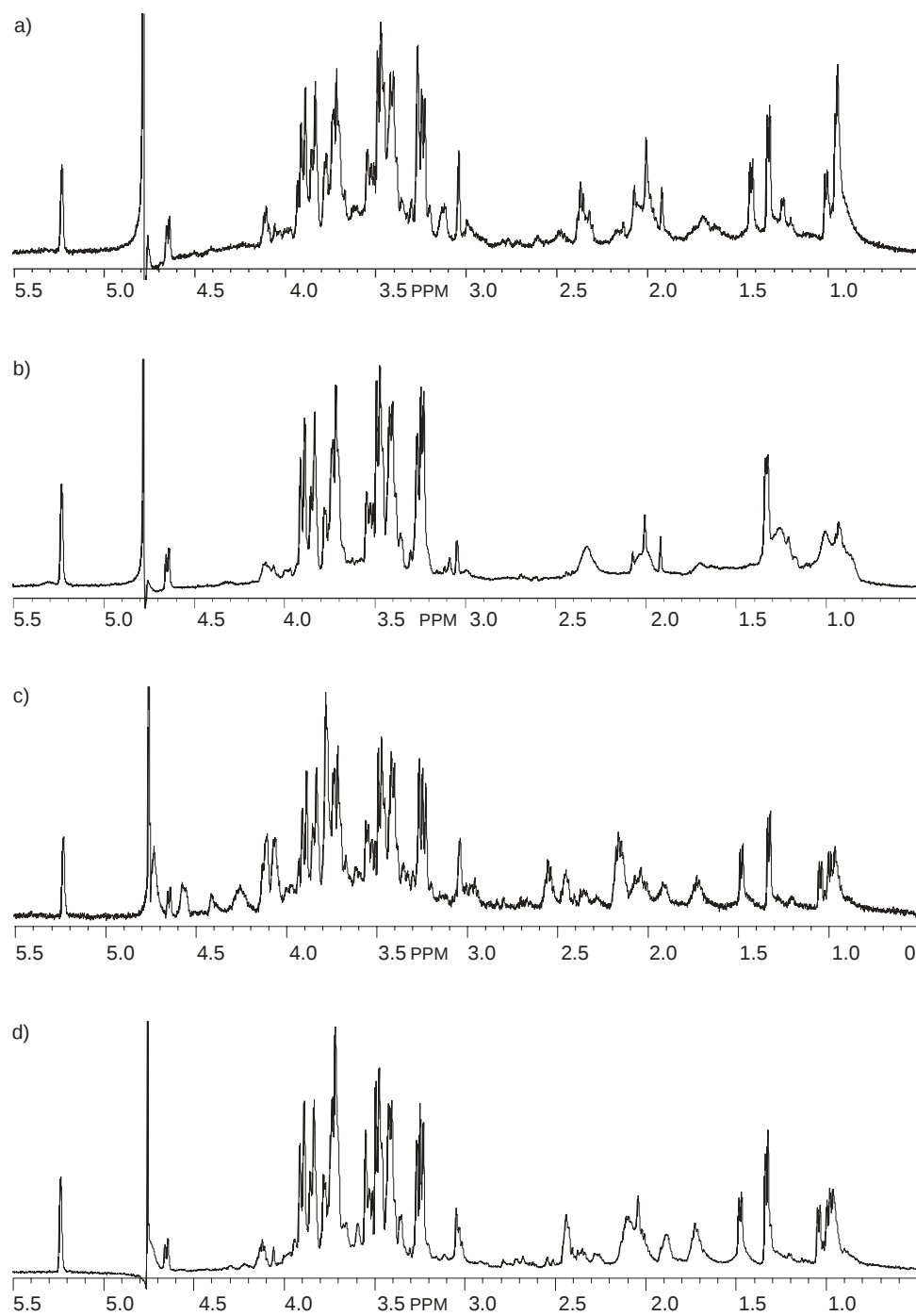


Figura 1.1. Espectros del estudio intra-métodos. a) sangre total, acetonitrilo; b) plasma, acetonitrilo; c) sangre total, ácido perclórico; d) plasma, ácido perclórico.

apreciables a simple vista entre los espectros procedentes de extractos perclóricos de plasma (d) y sangre total (c); en estos últimos se observó un mayor número de señales que en los del plasma (*Figura 1.1*). En la comparación inter-métodos existen diferencias apreciables en los espectros procedentes de

sangre total. Los espectros obtenidos con la precipitación de ácido perclórico (b) muestran mayor número de señales que los obtenidos con acetonitrilo (a) (*Figura 1.2*). Los espectros de plasma (c y d) no se diferencian a simple vista según el método de precipitación empleado.

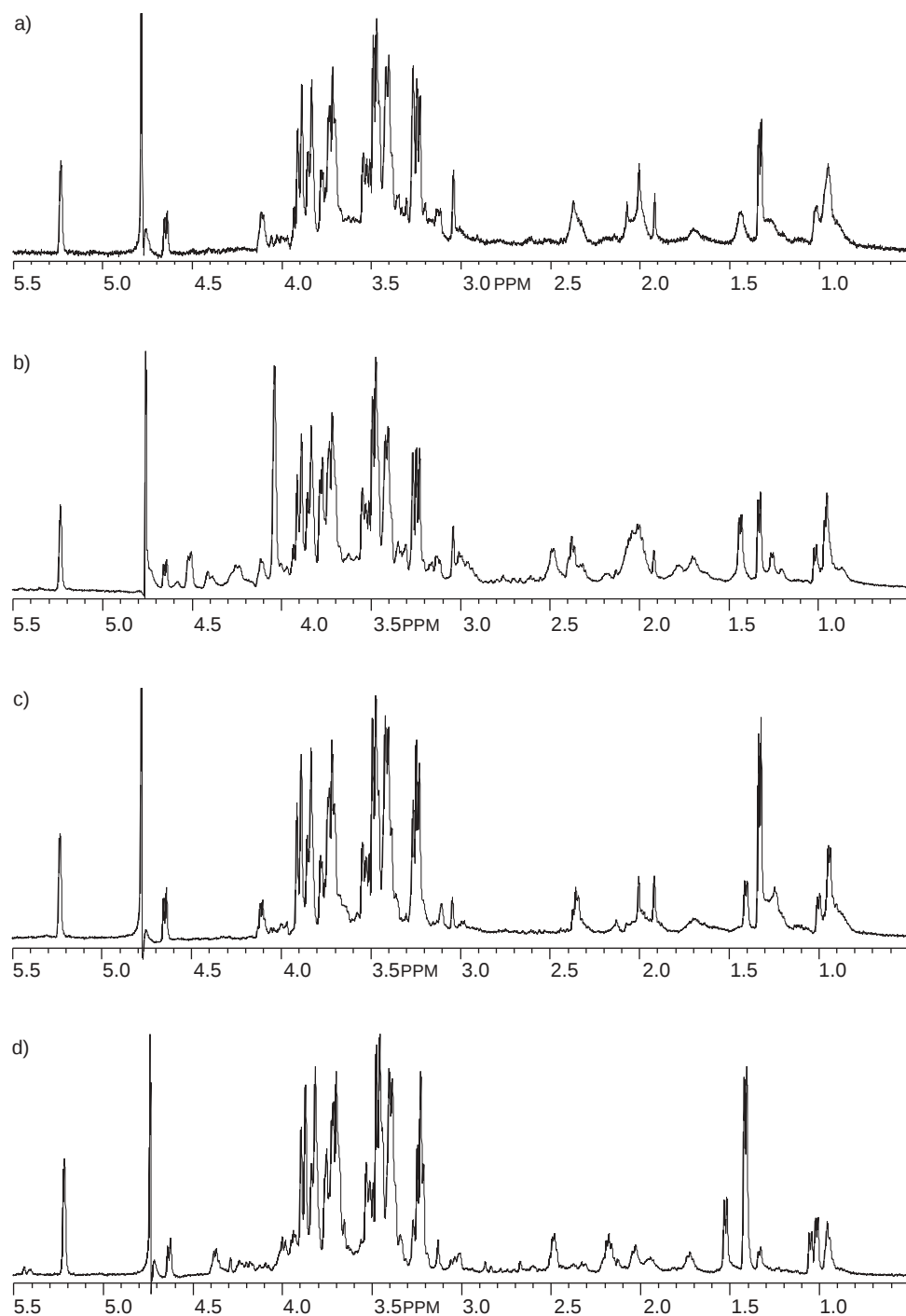


Figura 1.2. Espectro del estudio inter-métodos. a) acetonitrilo, sangre total; b) ácido perclórico, sangre total; c) acetonitrilo, plasma; d) ácido perclórico, plasma.

La figura 2 muestra las razones de la señal del estándar interno (TSP) en ambos ensayos (comparación intra-métodos e inter-métodos). Los valores encontrados en el estudio intra-métodos para el caso de la razón sangre total/plasma fue de 1.48 para la precipitación en acetonitrilo y 0.77 para la precipitación en ácido perclórico.

En el estudio inter-métodos los valores de la razón acetonitrilo/ácido perclórico fueron 2.44 y 1.47 para la sangre total y el plasma, respectivamente.

El cuadro I lista los valores de concentración encontrados para cada metabolito en las comparaciones inter-métodos e intra-métodos. En el estudio inter-

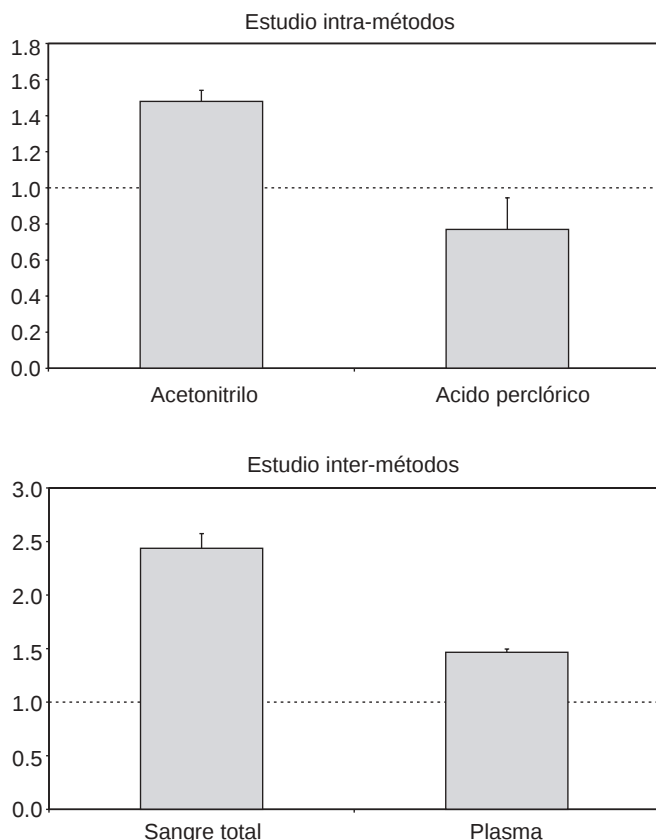


Figura 2. Razón de las áreas del TSP para los estudios intra-métodos e inter-métodos. La línea discontinua representa la relación teórica esperada para condiciones equivalentes de solubilidad y cantidad de sustancia extraída.

métodos se obtuvieron diferencias significativas para todos los metabolitos al comparar los dos métodos de precipitación en las muestras de sangre total. Se obtuvieron diferencias significativas para la valina, el lactato, la alanina y la glucosa al comparar los dos métodos de precipitación en las muestras de plasma. En el estudio intra-métodos se obtuvieron diferencias significativas para todos los metabolitos excepto la glucosa al comparar sangre total y plasma extraídos en ácido perclórico. No hubo diferencias significativas al comparar sangre total y plasma extraídos con acetonitrilo excepto para la creatina.

Los extractos en ácido perclórico parecen más afectados por el contenido residual de macromoléculas de la muestra como puede apreciarse del análisis cualitativo (existencia de picos anchos en la base del espectro) y del análisis cuantitativo.

Para verificar efectos indeseados en la cuantificación se prepararon muestras artificiales. El *cuadro II* lista el resultado de la cuantificación de los tres me-

tabolitos constituyentes de dichos espectros. Los espectros correspondientes pueden verse en la *figura 3*. En todos los casos, las concentraciones de los metabolitos fueron subestimadas, con valores de error promedio de $8 \pm 5\%$, excepto para la glucosa, cuyo error se calculó entre el 30-55%.

DISCUSIÓN

La deproteización de las muestras es un paso esencial en el estudio de fluidos biológicos empleando ERM;⁵ sin embargo, no siempre se realiza un adecuado proceso de selección del tipo de precipitación a emplear. En este estudio, se valoraron los efectos de dos métodos de precipitación que son empleados con frecuencia en extractos biológicos para la desproteización de muestras de sangre total y plasma.

A pesar de las opiniones de algunos autores, se encontraron menos variaciones que las esperadas entre los espectros de sangre total y plasma precipitados con acetonitrilo y ácido perclórico (*Figuras 1.1 y 1.2*). Aunque este estudio fue realizado a pH fisiológico, se encontró, a diferencia de Daykin y cols. (2002),⁵ pocas variaciones entre las muestras de plasma precipitadas con acetonitrilo y ácido perclórico. El espectro obtenido tras la precipitación en acetonitrilo reportado por Daykin y cols. presenta una severa distorsión de la línea base que no fue encontrada en los datos obtenidos en este trabajo y que es explicada por la mayor retención de lípidos y proteínas en la precipitación con ácido perclórico. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas y lipoproteínas presentes en el plasma son macromoléculas hidrosolubles y por tanto ciertos productos de la hidrólisis incompleta de esas proteínas, en forma de péptidos, podrían tener mayor presencia en la solución acuosa del ácido perclórico que en el acetonitrilo.

Existen diferentes fuentes de interferencias en la cuantificación absoluta de los metabolitos relacionadas con la naturaleza biológica de la muestra (por ejemplo, variaciones cíclicas fisiológicas), aspectos experimentales (por ejemplo, el procesamiento de las muestras) e instrumentales (por ejemplo, el ajuste de fase, la corrección de línea base, etc). Otra causa a considerar puede ser la variación indeseada de la cuantificación de la referencia interna, en este caso el TSP. La concentración de TSP añadida a las muestras fue de 0.029 mM; concentración que produjo suficiente señal en nuestros espectros aunque baja. En el estudio intra-métodos las señales del TSP fueron más intensas en los espectros provenientes de sangre total que en los espectros del plas-

Cuadro I. Comparación inter-métodos e intra-métodos. Las concentraciones expresadas en mM (Valor medio $\pm$ desviación estándar).

Comparación inter-método				
Metabolitos	Sangre total		Plasma	
	ACN	APC	ACN	APC
Valina	0.169 $\pm$ 0.029	0.316 $\pm$ 0.034*	0.088 $\pm$ 0.051	0.204 $\pm$ 0.067*
3-hidroxibutirato	0.016 $\pm$ 0.001	0.064 $\pm$ 0.014*	0.012 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.006
Lactato	0.653 $\pm$ 0.118	1.137 $\pm$ 0.157*	0.969 $\pm$ 0.090	1.504 $\pm$ 0.182*
Alanina	0.386 $\pm$ 0.056	0.712 $\pm$ 0.074*	0.105 $\pm$ 0.110	0.469 $\pm$ 0.094*
Acetato	0.099 $\pm$ 0.015	0.172 $\pm$ 0.037*	0.128 $\pm$ 0.023	0.049 $\pm$ 0.072
Creatina	0.220 $\pm$ 0.040	0.329 $\pm$ 0.035*	0.072 $\pm$ 0.008	0.040 $\pm$ 0.042
Glucosa	3.522 $\pm$ 0.664	5.853 $\pm$ 0.778*	3.660 $\pm$ 0.268	5.425 $\pm$ 0.709*
Comparación intra-método				
Metabolitos	Acetonitrilo		Ácido perclórico	
	Sangre total	Plasma	Sangre total	Plasma
Valina	0.327 $\pm$ 0.051	0.300 $\pm$ 0.041	0.452 $\pm$ 0.017	0.190 $\pm$ 0.068*
3-hidroxibutirato	0.038 $\pm$ 0.014	0.030 $\pm$ 0.012	0.057 $\pm$ 0.013	0.018 $\pm$ 0.009*
Lactato	0.779 $\pm$ 0.110	0.831 $\pm$ 0.073	1.300 $\pm$ 0.040	0.570 $\pm$ 0.196*
Alanina	0.378 $\pm$ 0.101	0.296 $\pm$ 0.165	0.784 $\pm$ 0.056	0.303 $\pm$ 0.098*
Acetato	0.110 $\pm$ 0.020	0.096 $\pm$ 0.023	0.030 $\pm$ 0.016	0.005 $\pm$ 0.004*
Creatina	0.343 $\pm$ 0.052	0.119 $\pm$ 0.007*	0.530 $\pm$ 0.007	0.115 $\pm$ 0.056*
Glucosa	3.635 $\pm$ 0.544	3.765 $\pm$ 0.427	7.095 $\pm$ 0.232	5.402 $\pm$ 1.858

ACN = acetonitrilo, APC = ácido perclórico. * t de Student, $p < 0.05$ **Cuadro II.** Cuantificación en los espectros artificiales compuestos por una mezcla de valina, lactato y glucosa a 5.0 mM (Std. A) y 2.5 mM (Std. B).

Metabolitos	Estándar A	Estándar B	Razón Estándar A/ Estándar B
Valina	4.73	2.29	2.07
Lactato	4.87	2.24	2.18
Glucosa	3.01	1.68	1.80

ma; sin embargo, la razón sangre/plasma del TSP fue mayor en el caso de la precipitación con acetonitrilo. Las señales del TSP en los espectros de acetonitrilo fueron más intensas que en los espectros de ácido perclórico en el estudio inter-métodos. De manera coincidente, la razón acetonitrilo/ácido perclórico del TSP fue mayor en las muestras de sangre (Figura 2), y ya que se utilizó la misma concentración del estándar interno en todas las muestras, puede afirmarse que la cantidad de sustancia máxima (componente con la mayor señal) obtenida en el extracto es menor cuando se utiliza acetonitrilo que en la precipitación con ácido perclórico. Esta mayor selectividad podría esperarse por el ligero carácter polar del acetonitrilo; aunque esto no significa que

todos los metabolitos recuperados después de la precipitación se obtienen en menor concentración al emplear el acetonitrilo. La recuperación con acetonitrilo es menor, de igual manera, en las muestras provenientes de sangre. Si se asume la relación entre las señales de acetonitrilo como un indicador de la relación entre la cantidad de sustancia extraída, puede estimarse teóricamente que del componente más extraído en ácido perclórico se obtendrá 1.5 veces más cantidad de sustancia en sangre que del mismo compuesto extraído con el acetonitrilo y sólo 0.5 veces más cantidad de sustancia en el plasma. El componente más extraído se recuperará 0.5 veces más en sangre que en plasma si se extrae con acetonitrilo y 0.3 veces menos en sangre que en plasma si se efectúa la extracción con ácido perclórico. En este caso, estas magnitudes podrían relacionarse con la glucosa, compuesto cuya concentración molar es, al menos, un orden de magnitud mayor que la de los otros compuestos presentes en el espectro. Como puede apreciarse en el *cuadro I*, la glucosa fue cuantificada con una concentración 1.5 veces más en la precipitación con ácido perclórico que con el acetonitrilo, independientemente del tipo de muestra (sangre total o plasma). En general, la concentración molar es superior para la extracción con ácido per-

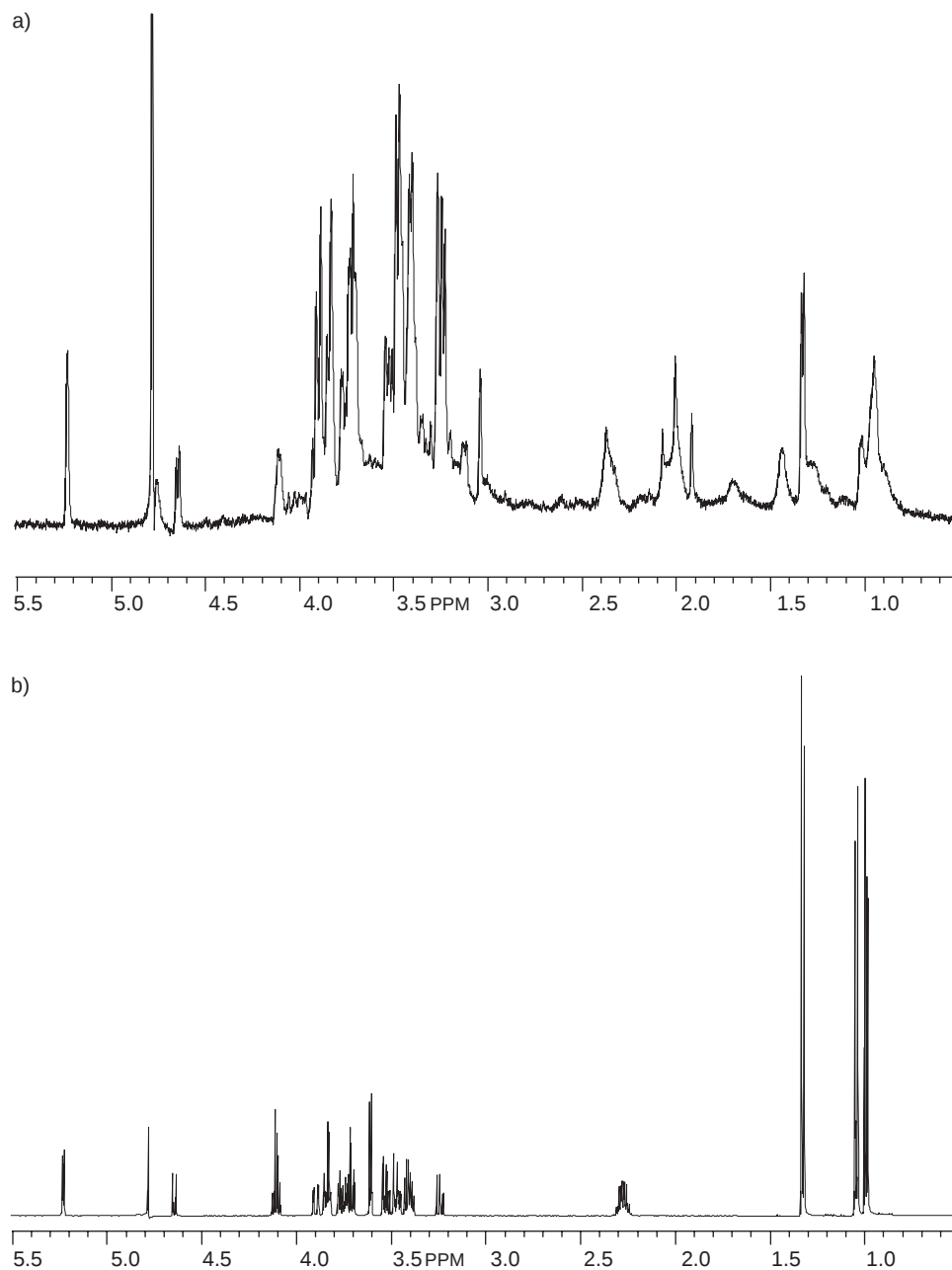


Figura 3. Espectro de sangre total, a) y espectro artificial reconstituido a partir de 3 metabolitos: valina, lactato y glucosa, b).

clórico. La existencia de diferencias al comparar los dos métodos de precipitación se explica por el arrastre selectivo de metabolitos en la fracción proteica eliminada en el proceso de precipitación por variaciones en las interacciones con las proteínas. Otro aspecto que debe influir es la diferencia en solubilidad que posee cada metabolito en el solvente respectivo, acuoso en un caso (ácido perclórico) y ligeramente polar en el acetonitrilo. Esto significa que no pueden compararse los metabolitos identificados en

el espectro utilizando diferentes métodos de desproteínización sobre bases cualitativas asumiendo igualdad de condiciones.

Los metabolitos valina y alanina cuantificados en las muestras de plasma se encuentran en el rango de valores reportados por Kriat y cols. (1992).¹¹ No sucede así con la glucosa y el lactato, los otros compuestos no fueron reportados en dicho trabajo. En estos últimos dos casos, los picos analizados se encuentran en las proximidades de la línea del agua y

la menor concentración se debe al efecto de saturación en estas señales debido a la irradiación selectiva de la línea del agua y un posible efecto de transferencia de magnetización. Se requiere un análisis más detallado para precisar el mecanismo, sin embargo, para los efectos de este trabajo es necesario tener en cuenta que la cuantificación, al menos en el intervalo 4-6 ppm, es afectada por la irradiación del agua y el tipo de pulso empleado para la saturación.

La concentración de los metabolitos en el extracto de sangre total es un valor promedio de las concentraciones existentes en los compartimientos plasmático y celular. Los extractos de plasma, por otra parte, sólo reflejan las concentraciones en el equilibrio plasmático de los diferentes compuestos. Llama la atención que no existan diferencias significativas al comparar las muestras de sangre total y plasma precipitadas con acetonitrilo pues debería esperarse una contribución de las células sanguíneas a la cuantificación como se aprecia con las muestras extraídas en ácido perclórico, a pesar de la corrección efectuada. Las diferencias entre un método y otro pueden explicarse por los patrones de solubilidad diferenciados (como se comprobó en el estudio inter-métodos), así como por diferencias en el mecanismo intrínseco de la precipitación. La ruptura celular en condiciones de acidez extrema y la precipitación de las proteínas constitutivas con el solvente acuoso permite suponer condiciones más apropiadas para la disolución del medio intracelular. En el caso de la precipitación con acetonitrilo, la formación de conglomerados celulares debido a interacciones de carácter hidrofóbico pueden dar lugar a espacios donde los metabolitos queden compartimentalizados y descartados en el *pellet* de los residuos proteicos. Este mecanismo diferenciado permite explicar porqué, a pesar de la contribución de la fracción celular, no se alcanzó una diferencia significativa en la extracción con acetonitrilo y sí en la extracción con ácido perclórico. En este sentido, Le Belle y cols. (2002)¹² han demostrado que cierta cantidad de compuestos pueden re-extraerse a partir del *pellet* celular. La existencia de diferencias en el comportamiento de ambos métodos presupone que la precipitación con ácido perclórico es más sensible a las variaciones del hematócrito que la precipitación con acetonitrilo.

La cuantificación de las sustancias en los espectros artificiales comprueba el efecto de saturación que ejerce sobre la señal de la glucosa, la irradiación de la señal del agua. Esta señal cae en un 30-40% y comprueba, una vez más, que es importante tener en cuenta este factor cuando se comparan metabolitos

cercanos a la frecuencia del agua (4.7 ppm) como es el caso de la glucosa (5.23 ppm y 4.65 ppm) y el lactato (señal correspondiente al grupo CH₃, 4.11 ppm). La valina (1.04 ppm) y el lactato (señal correspondiente al grupo CH₂, 1.33 ppm) se subestimaron demostrando que el error experimental puede estar entre un 5-10% (*Cuadro II*) y por tanto, sólo diferencias superiores al 10% deben considerarse importantes para valorar cualquier efecto.

Como conclusión se puede afirmar que los datos de este trabajo demuestran que la extracción en acetonitrilo y la extracción en ácido perclórico son útiles por igual en las muestras de sangre total y plasma aunque si se desea cuantificar compuestos con baja concentración es preferible la extracción con ácido perclórico. La precipitación con acetonitrilo es un procedimiento más simple, requiere menos tiempo y, en general, resulta en menos variación individual para los metabolitos estudiados. Es menos susceptible a variaciones en la concentración de los metabolitos derivadas del hematócrito y como consecuencia permite derivar resultados útiles a partir del estudio de sangre total. Es más selectiva y por tanto puede considerarse una forma de reducir el espectro protónico, muy conveniente cuando se quiere desarrollar métodos aplicables a la quimiométrica o al reconocimiento de patrones. Finalmente, es preciso añadir que cualquier intento de comparación requiere un preciso ajuste de las condiciones instrumentales y experimentales que debe hacerse sobre bases empíricas.

REFERENCIAS

1. Cady EB. *Clinical magnetic resonance spectroscopy*. New York: Plenum Press; 1990.
2. Bell JD, Brown JCC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids. *NMR Biomed* 1989; 2: 246-256.
3. Beckonert O, Monnerjahn J, Bonk U, Leibfritz D. Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ¹H-NMR spectroscopy and self-organizing maps. *NMR Biomed* 2003; 16: 1-11.
4. Griffin JL, Williams HJ, Sang E, Clarke K, Rae C, Nicholson JK. Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue. *Anal Biochem* 2001; 293: 16-21.
5. Daykin CA, Foxall PJD, Connor SC, Lindon JC, Nicholson JK. The comparison of plasma deproteinization methods for the detection of low-molecular-weight metabolites by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* 2002; 304: 220-230.
6. Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies of liver extracts and intact livers from rats treated with α -naphthylisothiocyanate. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 67-77.

7. Tate AR, Griffiths JR, Pérez-Martínez I, Moreno A, Barba I, Cabañas ME, et al. Towards a method for automated classification of ^1H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 1998; 11: 177-191.
8. Tate AR, Majós C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arús A. Automated classification of short echo time *in vivo* ^1H brain tumour spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med* 2003; 49: 29-36.
9. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 11: 1181-1189.
10. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 1995; 67: 793-811.
11. Kriat M, Confort-Gouny S, Vion-Dury J, Sciaky M, Viout P, Cozzzone PJ. Quantization of metabolites in human blood serum by proton magnetic resonance spectroscopy. A comparative study of the use of formate and TSP as concentration standards. *NMR Biomed* 1992; 5: 179-184.
12. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H -NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2002; 15: 37-44.

