

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Análisis metabolómico en muestras de sangre en Dry Blood Spot: Evaluación del
efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Cristhian Xavier Gallegos Velasco

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2024

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mi madre, padre, hermanos que han contribuido a mi crecimiento y soporte. A mi tutora, la Ph. D Fernanda Bertuccez por sus consejos, conocimientos, instrucciones e importantes contribuciones a mi crecimiento profesional. Al MSc. Diego Gallardo por alentarme al desarrollo como profesional. Al MSc. Luis Vaca por inculcarme los aprendizajes y valores básicos de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi hermana Cristina por sus consejos y enseñarme a esforzarme siempre. A mi madre María Pía por su apoyo. A mi padre Cristhian por siempre velar por mi bienestar. A mi hermano Christopher por ayudarme. A mis compañeros Raúl y Carla por que estuvieron ahí en momentos complicados. A mi primo Bruno por ser crítico y solidario conmigo. A mis amigos del discord por sacarme sonrisas en momentos tristes. A los diferentes maestros y profesoras de la universidad que me han enseñado cada una aspecto importante en la carrera.

Además, a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), cuna de mi formación académica y científica, que ha provisto un ambiente enriquecedor y de apoyo constante para mi desarrollo profesional. Agradezco al laboratorio de biomedicina de ESPOL por brindarme los recursos y la orientación necesarios para llevar a cabo mi investigación. Asimismo, extendo mi agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica (IKIAM), colaborador esencial en este estudio.

Declaración Expresa

Yo Cristhian Xavier Gallegos Velasco acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 30 de mayo del 2024.

Cristhian Gallegos

EVALUADORES

MSc. Diego Gallardo

PROFESOR DE LA MATERIA

Ph. D Fernanda Bertuccez

PROFESORA TUTOR

RESUMEN

El Dry Blood Spot técnica de muestreo que se destaca por su simplicidad y ser menos invasivo siendo especialmente valioso para recolectar muestras en poblaciones jóvenes y en áreas con recursos limitados. Sin embargo, el principal desafío radica en la potencial variabilidad de los metabolitos debido a las condiciones de almacenamiento, lo cual puede comprometer la validez de los datos obtenidos. El objetivo es identificar las condiciones de almacenamiento que minimizan la degradación de los metabolitos, crucial para la precisión en diagnósticos clínicos y estudios epidemiológicos. Se incluyó el uso de técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF para analizar las muestras, que fueron almacenadas a temperaturas de -80°C , -20°C , 4°C , 25°C y ambiente. En general, los resultados mostraron que las muestras mantenidas a -80°C presentaron la mayor estabilidad metabólica. Sin embargo, las temperaturas de -20°C y 4°C también proporcionaron condiciones aceptables de almacenamiento, aunque con una estabilidad ligeramente reducida comparada con -80°C , especialmente para períodos cortos. Mientras que temperaturas de 25°C no se recomienda su uso. En conclusión, la investigación subraya que, para muestras de sangre, aunque la temperatura de -80°C es ideal, las temperaturas de -20°C y 4°C son viables para el almacenamiento a corto plazo de muestras DBS. También, se destacó la necesidad de protocolos de almacenamiento precisos para asegurar la fiabilidad de los análisis metabólicos. Estos hallazgos son fundamentales para la implementación eficaz de DBS en estudios clínicos y epidemiológicos.

Palabras Clave: Dry Blood Spot, estabilidad metabólica, MALDI-TOF, muestreos accesibles

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	3
RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL	II
ABREVIATURAS.....	VI
SIMBOLOGÍA	VI
CAPÍTULO 1	7
1. Introducción	7
1.1 Descripción del problema	7
1.2 Justificación del problema	8
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo general.....	10
1.3.2 Objetivos específicos	10
1.4 Marco teórico	10
1.4.1 Introducción a la metabolómica.....	10
1.4.2 Perfiles metabolómicos.....	11
1.4.3 Técnicas analíticas en metabolómica.....	11
1.4.4 Importancia de las muestras de sangre en "Dry Blood Spot" (DBS).....	13
1.4.5 Impacto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en DBS	13
1.4.6 Estudios y hallazgos relevantes	14

1.4.7	Desafíos y consideraciones en la estabilidad de metabolitos.....	15
1.4.8	Aplicaciones clínicas y epidemiológicas de DBS.....	15
1.4.9	Estudios internacionales.....	16
CAPÍTULO 2.....		17
2.	Metodología	17
2.1	Preparación de materiales y equipos.....	17
2.2	Recolección y procesamiento de muestras de sangre	18
2.3	Distribución de muestras y condiciones de almacenamiento	20
2.4	Extracción de metabolitos.....	21
2.5	Perfil metabolómico.....	23
2.6	Análisis estadístico y validación de datos.....	25
2.7	Consideraciones éticas	25
CAPÍTULO 3.....		26
3.	Resultados y discusión.....	26
3.1	Sangre total	26
3.1.1	Por día.....	26
3.1.2	Por temperatura.....	30
3.1.3	Condiciones óptimas.....	34
3.2	Suero	35
3.2.1	Por día.....	35

3.2.2	Por temperatura.....	39
3.2.3	Condiciones óptimas.....	42
3.3	Plasma.....	42
3.3.1	Por día.....	43
3.3.2	Por temperatura.....	46
3.3.3	Condiciones óptimas.....	50
3.4	Consideraciones para protocolo de almacenamiento.....	50
3.4.1	Temperatura de almacenamiento.....	51
3.4.2	Preparación y procesamiento de las muestras.....	51
3.4.3	Control de calidad y monitoreo.....	52
3.4.4	Documentación rigurosa.....	52
3.4.5	Consideraciones específicas para estudios metabolómicos.....	52
CAPÍTULO 4.....		54
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	54
4.1	Conclusiones.....	54
4.2	Recomendaciones.....	55
4.2.1	Establecimiento de protocolos de almacenamiento estrictos.....	55
4.2.2	Implementación de DBS.....	56
4.2.3	Desarrollo de mejores prácticas y estándares.....	56
4.2.4	Extender la investigación sobre la estabilidad de biomarcadores.....	56

BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO.....	62
Detalle materiales	62

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
DBS	Dried Blood Spot
TOF	Tiempo de vuelo
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por una matriz
ST	Sangre total
S	Suero
P	Plasma
UV	ultravioleta

SIMBOLOGÍA

ml	mililitro
v	volumen
μl	microlitro
g	gravedad
rpm	revoluciones por minuto
Hz	hercio
V	voltios

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

El Dry Blood Spot (DBS) es una técnica de muestreo que ha ganado popularidad como un método menos invasivo y económico para recolectar muestras de sangre capilar mediante un simple pinchazo en el dedo. Este método es especialmente beneficioso para recolectar muestras en poblaciones infanto-juveniles y en comunidades de bajos recursos (Fischer et al., 2019).

Además, las muestras de DBS, una vez secas, son más estables que el plasma a temperaturas más altas, lo que reduce la necesidad de cadenas de frío estrictas hasta su almacenamiento a largo plazo (Pumford, et al., 2020).

En este contexto, la metabolómica emerge como una herramienta poderosa para el diagnóstico clínico, la detección temprana de enfermedades y la evaluación del estado general de salud. El análisis metabolómico en muestras de DBS ofrece una alternativa eficaz a la recolección de sangre venosa para estudios metabolómicos y epidemiológicos (Li et al., 2020). Sin embargo, la estabilidad de los metabolitos en las muestras de DBS puede verse significativamente afectada por el tiempo y las condiciones de almacenamiento, lo que representa un desafío importante para la validez de los datos obtenidos. Evaluar el impacto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en los perfiles metabolómicos es crucial para mitigar errores en los resultados y diagnósticos (Hasam, et al., 2021).

Una de las principales problemáticas en el diagnóstico utilizando perfiles metabolómicos es la obtención de datos precisos y confiables en estudios a largo plazo, especialmente en contextos clínicos y epidemiológicos donde las muestras de DBS se utilizan cada vez más (Fischer et al., 2019). La variabilidad en las condiciones de almacenamiento puede introducir errores significativos en la interpretación de los resultados, afectando la fiabilidad y precisión de

las investigaciones y, en última instancia, el desarrollo de intervenciones y tratamientos basados en estos hallazgos (Li, et al., 2020).

A través de este proyecto, se pretende analizar diferentes formas de almacenamiento para determinar condiciones, diferentes a las utilizadas comúnmente en laboratorios, que permitan mantener la estabilidad de los metabolitos en DBS. La observación y medición de la estabilidad de los metabolitos bajo diferentes condiciones de almacenamiento es susceptible de ser analizada de manera sistemática, utilizando desorción-ionización por láser asistido por matriz -tiempo de vuelo (matrix assisted laser desorption ionization time of flight, MALDI-TOF). Estas tecnologías permitirán evaluar la variabilidad en los perfiles metabolómicos y determinar las condiciones óptimas que preserven la integridad de las muestras a lo largo del tiempo.

1.2 Justificación del problema

La necesidad de abordar la estabilidad de los metabolitos en muestras de sangre en "Dry Blood Spot" (DBS) bajo diferentes condiciones de almacenamiento es crucial para asegurar la validez y confiabilidad de los estudios metabolómicos (Clish, 2015). La precisión de los perfiles metabolómicos es fundamental para la identificación de biomarcadores y el desarrollo de intervenciones terapéuticas basadas en datos. La variabilidad introducida por las condiciones de almacenamiento puede comprometer significativamente la calidad de los datos, lo que afecta negativamente la interpretación de los resultados y, en última instancia, las decisiones clínicas y de salud pública que dependen de estos estudios (Liu, et al., 2021).

La principal justificación para abordar este problema es la mejora de la precisión y fiabilidad de los datos metabolómicos. Estudios previos han demostrado que los metabolitos en DBS pueden ser estables a ciertas temperaturas, pero esta estabilidad puede variar considerablemente dependiendo de las condiciones de almacenamiento (Gupta & Mahajan,

2018). Al identificar y recomendar las mejores prácticas de almacenamiento, se puede asegurar que los datos obtenidos sean representativos y precisos, minimizando errores y sesgos en la investigación (Li, et al., 2020).

En la práctica clínica, la importancia de utilizar Dry Blood Spot (DBS) radica en su naturaleza menos invasiva comparada con las técnicas de muestreo tradicionales, como la extracción de sangre venosa (Xue et al., 2018). Esta característica es especialmente valiosa en poblaciones vulnerables como niños, ancianos y personas ubicadas en áreas remotas. Al ser menos invasivos de los procedimientos de recolección, el DBS facilita la participación en estudios longitudinales y de desarrollo que requieren múltiples puntos de recolección de muestras sin someter a los participantes a estrés adicional (Wang, et al., 2021).

En el contexto de la investigación, el uso de DBS se extiende más allá de su simplicidad y no invasiva. En estudios epidemiológicos a gran escala y en contextos de recursos limitados, donde el acceso a infraestructura avanzada para almacenamiento en frío puede ser escaso, las muestras de DBS ofrecen una ventaja significativa (Li, et al., 2020). Son fáciles de recolectar, almacenar y transportar, y su estabilidad a temperaturas más altas reduce los requisitos para cadenas de frío estrictas, lo que disminuye los costos asociados con el transporte y almacenamiento de muestras biológicas. Estos beneficios logísticos y económicos hacen que el DBS sea ideal para la recolección de muestras en áreas donde la infraestructura de almacenamiento en frío es limitada o inexistente (Pumford, et al., 2020).

Optimizar las condiciones de almacenamiento de las muestras de DBS tiene implicaciones críticas tanto para la práctica clínica como para la investigación. Al establecer protocolos de almacenamiento robustos, se permite la realización de estudios más consistentes y comparables, lo que facilita la validación de hallazgos y el desarrollo de nuevos biomarcadores (Malsagova et al., 2020). Además, mejorar la estabilidad de los metabolitos en estas muestras es

crucial para asegurar la fiabilidad de los datos recolectados, especialmente en estudios que involucran análisis metabolómico. Esto contribuye a la mejora continua del marco de herramientas metabolómicas utilizadas en diversas aplicaciones científicas y médicas (Clish, 2015).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Analizar la estabilidad del perfil metabolómico de muestra de sangre en DBS para la comparación del efecto de los cambios de temperatura y tiempo mediante espectrometría de masa por MALDI-TOF

1.3.2 Objetivos específicos

- Comparar la estabilidad de los perfiles metabolómicos con respecto a la temperatura y tiempo de almacenaje mediante análisis de componente principales
- Comprobar la efectividad del Dried Blood Spot como técnica de muestreo para definir las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento óptimas

1.4 Marco teórico

1.4.1 Introducción a la metabolómica

La metabolómica es el estudio exhaustivo de los metabolitos pequeños, también conocidos como metabolitos, en un sistema biológico (Chen et al., 2022). Estos metabolitos son productos finales de las rutas metabólicas y proporcionan una visión integral de los procesos bioquímicos en curso dentro de una célula, tejido u organismo (Roessner & Bowne, 2009). La metabolómica puede dividirse en dos enfoques principales: dirigida y no dirigida. La metabolómica dirigida se enfoca en cuantificar un conjunto específico de metabolitos conocidos,

mientras que la no dirigida intenta identificar y cuantificar todos los metabolitos presentes en la muestra sin hipótesis preconcebidas (Liu, et al., 2021).

1.4.2 Perfiles metabolómicos

Un perfil metabolómico es el conjunto de metabolitos que se encuentra en un organismo o muestra biológica en un momento específico. Este perfil proporciona una instantánea del estado metabólico del organismo, reflejando las interacciones complejas y dinámicas de sus procesos bioquímicos. La creación de perfiles metabolómicos permite la identificación de cambios en las concentraciones de metabolitos que pueden estar asociados con enfermedades, respuestas al tratamiento o variaciones fisiológicas (Buergel et al., 2022). Al analizar estos perfiles, los investigadores pueden detectar biomarcadores potenciales para el diagnóstico precoz de enfermedades, monitorear la progresión de patologías y evaluar la efectividad de intervenciones terapéuticas (Shah et al., 2012). Además, los perfiles metabolómicos facilitan una comprensión más profunda de las rutas metabólicas y su regulación, ofreciendo insights valiosos sobre la biología subyacente de diversas condiciones clínicas y fisiológicas (Raffone, et al., 2020).

1.4.3 Técnicas analíticas en metabolómica

Las técnicas analíticas empleadas en la metabolómica son variadas y se escogen en función del trabajo de investigación, recursos, tiempo o tipo de muestra por analizar. Las principales técnicas incluyen:

- **Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS):** En el campo de la metabolómica es la técnica más versátil por su alta sensibilidad y capacidad para analizar una amplia gama de metabolitos. La LC-MS puede separar metabolitos en

función de sus propiedades químicas y luego identificarlos y cuantificarlos mediante espectrometría de masas (Coelho, et al., 2020).

- **Tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF):**

Es una técnica avanzada de espectrometría de masas utilizada para identificar moléculas basándose en su masa y carga. Se utiliza en este estudio debida por su rapidez y eficiencia, permitiendo análisis rápidos que son esenciales en laboratorios clínicos y de investigación. Es altamente sensible y específica, capaz de detectar moléculas en muestras muy diluidas, lo que la hace ideal para estudios que requieren la detección de compuestos a niveles de trazas. MALDI-TOF es especialmente útil para analizar macromoléculas como proteínas y péptidos, aplicándose en una variedad de campos, incluyendo la identificación de microorganismos en microbiología clínica, análisis de proteínas en biología molecular, y en la industria farmacéutica para el control de calidad. Además, requiere una preparación de muestra relativamente simple y es no destructiva, permitiendo que las muestras puedan ser recuperadas y reanalizadas si es necesario (Singhal, et al., 2015).

- **Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR):** Aunque menos sensible que las técnicas de espectrometría de masas, la NMR proporciona información estructural detallada de los metabolitos y es no destructiva (Yang, et al., 2020).

- **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):** Utilizada principalmente para metabolitos volátiles y semivolátiles, esta técnica ofrece una resolución más alta y permite de forma precisa cuantificar (Luo, et al., 2021).

1.4.4 Importancia de las muestras de sangre en "Dry Blood Spot" (DBS)

Las muestras de DBS ofrecen una alternativa menos invasiva y más práctica a la recolección de sangre venosa, especialmente en estudios epidemiológicos y clínicos de gran escala. Las DBS se obtienen mediante un simple pinchazo en el dedo, y la sangre recolectada se deja secar en una tarjeta de filtro. Una vez secas, estas muestras son más estables y fáciles de almacenar y transportar que las muestras de plasma, lo que reduce la necesidad de una cadena de frío estricta (Wang, et al., 2021).

1.4.5 Impacto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en DBS

La estabilidad de los metabolitos en DBS es un factor crítico que puede influir significativamente en la precisión de los análisis metabolómicos. Se ha visto como ciertas condiciones de temperatura y tiempo, posee un degradación e impacto en la estabilidad de los metabolitos de diferentes maneras (Li, et al., 2020) (Moat, et al.,2020):

- **Temperaturas ultra-bajas (-80 °C):** Las temperaturas ultra-bajas son las más efectivas para preservar la estabilidad de los metabolitos en DBS a lo largo del tiempo. Estudios han mostrado que los perfiles metabolómicos permanecen estables durante varios meses cuando las muestras se almacenan a -80 °C.
- **Temperaturas de congelación (-20 °C):** Las temperaturas de congelación también ofrecen una alternativa viable para el almacenamiento de DBS, aunque con una menor eficacia en la preservación de algunos metabolitos en comparación con las temperaturas ultra-bajas. La estabilidad de los perfiles metabolómicos a -20 °C es intermedia entre las temperaturas ultra-bajas y de refrigeración.
- **Temperaturas de refrigeración (4 °C):** Las muestras almacenadas a 4 °C presentan mayor inestabilidad en comparación con las almacenadas a temperaturas ultra-bajas. Sin

embargo, ciertos metabolitos, especialmente los lípidos, pueden mantenerse relativamente estables a esta temperatura por períodos más cortos.

- **Temperatura ambiente (25 °C):** llamada también como temperatura del entorno en el que se almacenan las muestras, es un factor crítico en la estabilidad de los metabolitos en las muestras de sangre seca en tarjeta de filtro (DBS). Las muestras almacenadas a temperatura ambiente suelen ser más susceptibles a la degradación de los metabolitos debido a la actividad enzimática residual y reacciones químicas no controladas. Estudios han demostrado que las temperaturas más altas aceleran la descomposición de ciertos metabolitos, lo que puede introducir variabilidad y afectar la precisión de los perfiles metabolómicos obtenidos.

1.4.6 Estudios y hallazgos relevantes

Varios estudios han investigado la estabilidad de los metabolitos en DBS bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Un estudio realizado por Petrick et al. (2021) evaluó los efectos de las temperaturas de almacenamiento (4 °C, -20 °C y -80 °C) en los perfiles metabolómicos de DBS utilizando LC-MS. Los resultados indicaron que las muestras almacenadas a -80 °C mostraron la mayor estabilidad, seguidas por las almacenadas a -20 °C, mientras que las muestras a 4 °C presentaron una mayor variabilidad en la estabilidad de los metabolitos.

Otro estudio, realizado por Odom y Sutton (2021), exploró las aplicaciones de la metabolómica en la práctica clínica y destacó la importancia de las condiciones de almacenamiento para la obtención de datos confiables. Este estudio subrayó que la estabilidad de los metabolitos es esencial para el diagnóstico preciso y la identificación de biomarcadores.

1.4.7 Desafíos y consideraciones en la estabilidad de metabolitos

- **Variabilidad en la hematocrito:** La variabilidad en el contenido de hematocrito en las muestras de DBS puede afectar la homogeneidad y, por ende, la estabilidad de los metabolitos. Los dispositivos de microsampling volumétrico, como los microsamplers Mitra, pueden ayudar a mitigar este problema al recolectar volúmenes precisos de sangre (Moat, et al., 2020).
- **Efectos del tiempo de almacenamiento:** El tiempo de almacenamiento también afecta a la estabilidad de los metabolitos. Los estudios han mostrado que ciertos metabolitos pueden degradarse más rápidamente que otros, lo que subraya la necesidad de establecer tiempos de almacenamiento óptimos para diferentes tipos de metabolitos (Li, et al., 2020).
- **Condiciones de transporte:** Las condiciones de transporte pueden influir en la estabilidad de las muestras. Es esencial asegurar que las muestras sean transportadas en condiciones previamente descritas que minimicen la degradación de los metabolitos (Liu, et al., 2021).

1.4.8 Aplicaciones clínicas y epidemiológicas de DBS

Las muestras de DBS tienen amplias aplicaciones en estudios clínicos y epidemiológicos debido a su facilidad de recolección y transporte. En estudios de enfermedades metabólicas, autismo, cáncer y enfermedades infecciosas, las DBS permiten la recolección de datos longitudinales y la monitorización de biomarcadores en diferentes etapas de la enfermedad. Además, durante la pandemia de COVID-19, las muestras de DBS demostraron ser una herramienta invaluable para la recolección de muestras en entornos no clínicos, facilitando el seguimiento y la investigación epidemiológica en poblaciones grandes (Wang, et al., 2021).

1.4.9 Estudios internacionales

- **Petrick et al. (2021):** Este estudio evaluó los efectos de almacenamiento a 4 °C, -20 °C y -80 °C en los perfiles metabolómicos de DBS utilizando LC-MS. Los resultados indicaron que las muestras almacenadas a -80 °C mostraron la mayor estabilidad, seguidas por las almacenadas a -20 °C, mientras que las muestras a 4 °C presentaron mayor variabilidad en la estabilidad de los metabolitos.
- **Delahaye et al. (2021):** Investigaron el uso de microsamplers volumétricos para recolectar volúmenes precisos de sangre, mitigando problemas de variabilidad en hematocrito que afectan la homogeneidad y estabilidad de los metabolitos en DBS. Este estudio subraya la importancia de la precisión en la recolección de muestras para mejorar la fiabilidad de los análisis metabolómicos.
- **Freeman et al. (2018):** Revisaron métodos para el análisis de una amplia gama de compuestos en DBS, incluyendo drogas de abuso, metabolitos endógenos, elementos traza, contaminantes ambientales y biotoxinas. Destacaron la importancia de las condiciones de almacenamiento para la estabilidad de estos compuestos y la necesidad de protocolos estandarizados.
- **Odom y Sutton (2021):** Exploraron las aplicaciones de la metabolómica en la práctica clínica y destacaron la importancia de las condiciones de almacenamiento para la obtención de datos confiables. Este estudio enfatiza que la estabilidad de los metabolitos es esencial para el diagnóstico preciso y la identificación de biomarcadores.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Este es un estudio longitudinal que ha utilizado muestras de sangre de un único participante. En el estudio las muestras de sangre son utilizadas para verificar el efecto del tiempo (Día 0, Día 1, Día 7 y Día 14) y de la temperatura (25 °C, 4 °C, -20 °C y -80 °C) en muestras de DBS.

2.1 Preparación de materiales y equipos

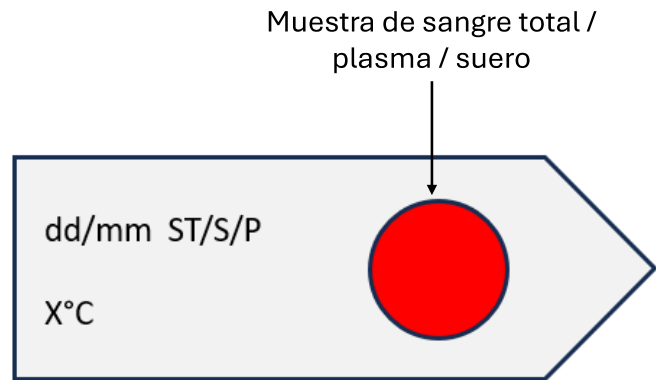
El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guayaquil, con un carácter de enfoque integrador para la gestión de muestras biológicas. La preparación adecuada del material es crucial para asegurar la integridad de las muestras y la precisión de los resultados. La preparación y etiquetado de todos los materiales necesarios para la recolección y almacenamiento de las muestras fue realizado considerando los diferentes días de análisis y las temperaturas utilizadas para mantener las muestras. Para este estudio, se utilizó el papel filtro Whatman® (Sigma-Aldrich, MI, EUA). Cada círculo fue cortado en tiras para aplicación de la respectiva muestra como se muestra en la Figura 1 A y B.

Figura 1

Material y organización esquemática de la aplicación de la muestra en papel filtro Whatman® 1.



A



B

Nota: A: Papel filtro de 42.5 mm de diámetro. B: Modelo de organización del papel que incluye fecha de toma de muestra, tipo de muestra (ST/S/P) y la temperatura (X°C) en que la muestra es almacenada.

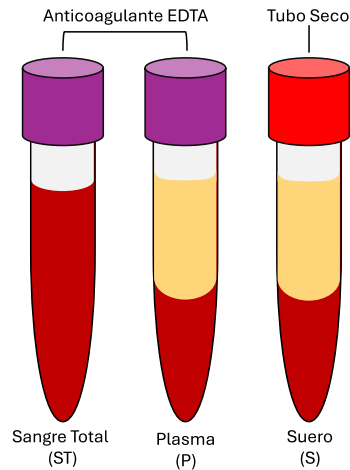
2.2 Recolección y procesamiento de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron tomadas con tubos con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un tubo seco. Los tubos con EDTA fueron utilizados para obtener sangre total y plasma, mientras que el tubo seco ha sido utilizado para recolección de suero (Figura 2).

En la Figura 2 se muestra la diferencia de los tipos de muestras, entre sangre, suero y plasma. Las cuales se utilizaron ya que cada tipo de muestra puede presentar un perfil metabólico distinto y una estabilidad diferente bajo las mismas condiciones de almacenamiento. Lo que permite ampliar los resultados del estudio (Li, et al., 2020).

Figura 2

Tipos de tubos de recolección de muestras de sangre.



Nota: Muestras de sangre total y de plasma se obtuvieron con tubos de EDTA. La muestra de suero se obtuvo con tubo seco.

La recolección de muestras de sangre se realizó siguiendo los procedimientos estándar para asegurar la calidad y la cantidad adecuada de sangre necesaria para los análisis posteriores. La toma de sangre se llevó a cabo mediante venopunción utilizando sistema vacutainer (Industrias Químicas y Biológicas, 2024). Los tubos con las muestras pasaron por un proceso de pre-sedimentación de la sangre antes de la centrifugación. En este proceso, los componentes de la sangre comienzan a separarse antes de la centrifugación para facilitar una mejor separación de los distintos componentes sanguíneos (por ejemplo, plasma, células rojas, células blancas, plaquetas). Para esto, la muestra de sangre quedó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la pre-sedimentación, las muestras fueron centrifugadas a $1600 \times g$ durante 15 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3 Distribución de muestras y condiciones de almacenamiento

Las muestras procesadas se distribuyeron en los papeles filtro preparados y se almacenaron bajo condiciones controladas para evaluar la estabilidad de los metabolitos. En la tabla 2 y 3 se observa un resumen de la distribución de las muestra por papel a analizar.

Tabla 1

Codificación utilizada para rotulado y distribución de experimento

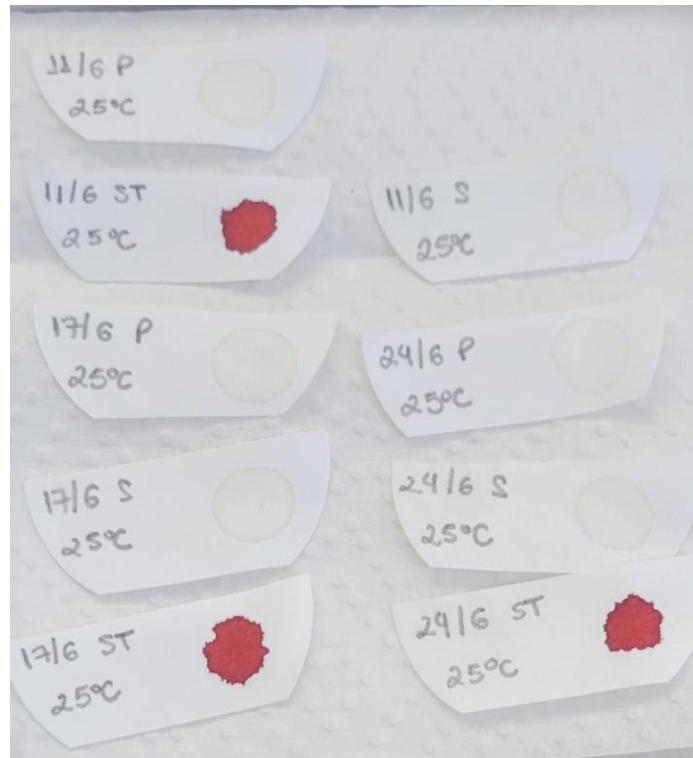
TEMPERATURA	"25°C"	"4°C"	"-20°C"	"-80°C"
TIEMPO				
1 hora	1ST,1S,1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P
1 día	1ST,1S,1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P
1 semana	1ST,1S,1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P
2 semanas	1ST,1S,1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P	1ST, 1S, 1P

Nota. Cada celda contiene 3 muestras, dando un total de 48 muestras. ST = Sangre total, S = Suero, P = plasma.

Se pipetearon volúmenes de 10 µL de sangre total, plasma y suero (Figura 3) en los diferentes sectores del papel filtro. Las muestras se almacenaron en las cuatro diferentes condiciones de temperatura (25 °C, 4 °C, -20 °C, -80 °C) y los cuatro diferentes intervalos de tiempo distintos (1 hora, 1 día, 1 semana, 2 semanas), para evaluar la estabilidad metabólica bajo diversas condiciones.

Figura 3

Modelo de distribución de muestras en cada tira de papel



Nota. La Figura muestra cómo se distribuyó la sangre, suero y plasma por tiempo y temperatura

2.4 Extracción de metabolitos

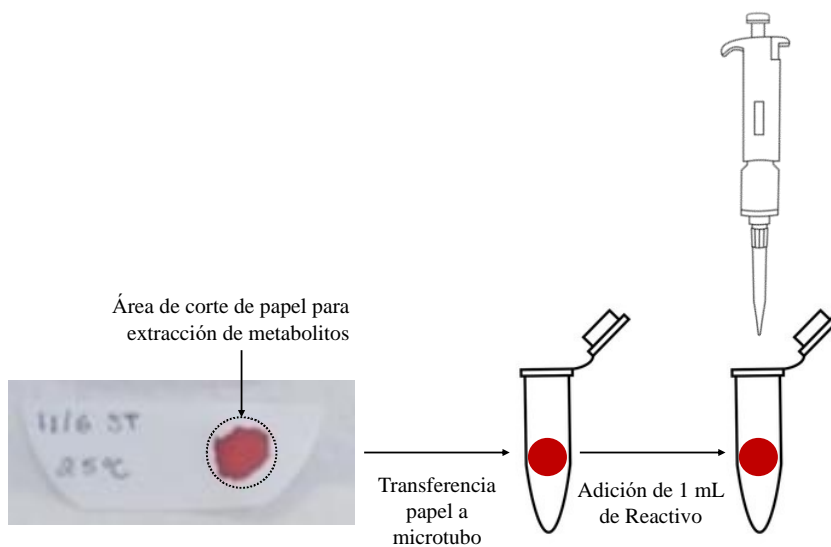
Una vez completado el periodo de almacenamiento para cada tipo de muestra en sus respectivas condiciones de temperatura, se procedió a la extracción y análisis de los metabolitos. La extracción de metabolitos se realizó en 4 momentos, es decir, 12 extracciones de las 12 muestras por cada tiempo de almacenamiento.

Antes de iniciar la extracción, la cabina de flujo laminar se dejó bajo luz UV durante al menos 25 minutos y se desinfectó con cloro al 1% y etanol al 70% y para asegurar un ambiente estéril. Se prepararon y marcaron 48 tubos eppendorf, los cuales fueron llenado de 1 ml de buffer de extracción de cloroformo/metanol/agua (1:1:1, v/v/v) (Figura 4).

Se procedió con el recorte de forma circular donde la muestra se encontraba seca dentro del papel. Posteriormente, se sumergió cada recorte en un respectivo tubo dejando incubar por 20 min a 4 °C, con el fin de que se desprendieran la mayor cantidad de metabolitos. Una vez terminada la incubación, Las soluciones extraídas se centrifugaron a $16000 \times g$ durante 10 minutos para eliminar los residuos sólidos. Se traspasaron 800 μL del sobrenadante a nuevos tubos eppendorf previamente rotulados (Figura 5). Al finalizar esta etapa se guardaron cada 12 tubos por día respectivo de extracción a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 4

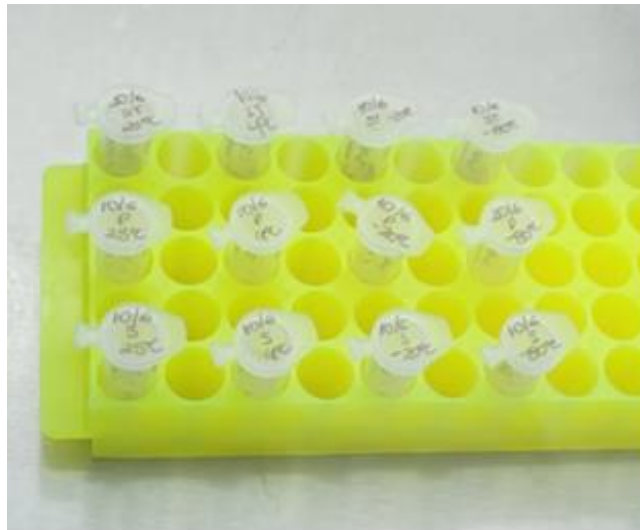
Diagrama de extracción de metabolitos por muestra



Nota. Extracción de metabolitos desde muestra seca a tubo con reactivo

Figura 5

Disposición e incubación de muestras



Nota. La Figura muestra cada tubo etiquetado con su respectivo código.

Una vez finalizado el último día de extracción, los 48 tubos fueron trasladados a la Universidad Regional Amazónica (IKIAM) a temperatura $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El análisis del perfil de metabolitos se realizó en el laboratorio de productos naturales de IKIAM.

2.5 Perfil metabolómico

En análisis del perfil metabolómico de las muestras DBS se realizó por MALDI-TOF debido a su capacidad para realizar un análisis rápido y detallado de los perfiles metabolómicos (Singhal, et al., 2015).

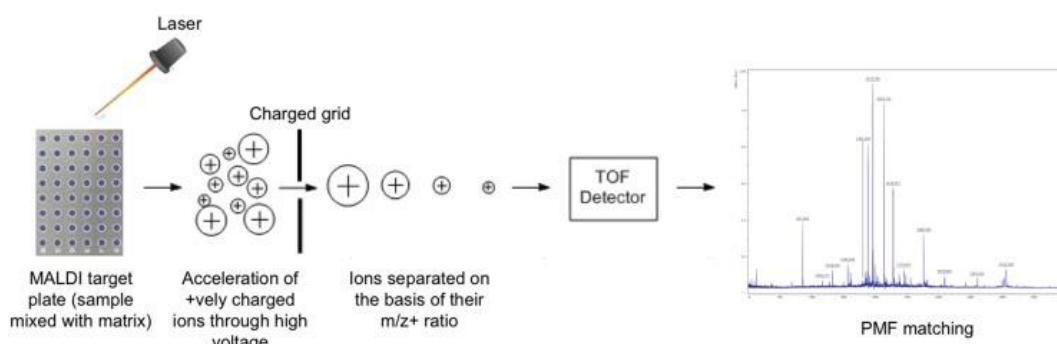
Para el perfil metabolómico mediante MALDI-TOF los extractos pasaron por un proceso de concentración de metabolitos mediante speedvac, en que las muestras son centrifugadas a 8000 g por 5 minutos. Después de que los tubos están secos y los metabolitos apegados a la pared de los tubos, a cada tubo se agrega $10\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo para concentración y recuperación de metabolitos.

Para el análisis MALDI-TOF MS, cada muestra se analizó en tres replicas técnicas. Se depositaron 2 μL de cada muestra en la placa de MALDI y se cubrieron con 1 μL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB 0,5 M) disuelto en metanol al 90%. Los espectros de masas se adquirieron en el modo de iones positivos utilizando un espectrómetro de masas Shimadzu equipado con un láser de estado sólido de 200 Hz en el rango masa/carga (m/z) 100–1000 en el modo reflectrón (Figura 6). Las condiciones de operación típicas fueron: energía láser 250 u.a., placa de muestra 20 V y las energías de colisión de Trampa y Transferencia fueron 6 y 4 V, respectivamente.

La elección de MALDI-TOF como técnica analítica se justificó por su eficacia en la identificación de pequeñas moléculas y su capacidad para realizar análisis rápidos. (Wang, et al. 2021).

Figura 6

Esquema fundamentos y procesamiento por MALDI-TOF



Nota. La Figura muestra el procesamiento por MALDI-TOF hasta obtener un perfil

(Tomada de Singhal, et al., 2015).

2.6 Análisis estadístico y validación de datos

Los datos obtenidos por MALDI-TOF fueron analizados utilizando el software Metaboanalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Para este análisis se consideró el uso de estadística multivariada mediante el análisis de componentes principales (PCA). Para esto, se preprocesaron los datos utilizando escalado por Pareto. El PCA ha sido utilizado para visualizar las diferencias en los perfiles metabolómicos y clasificar las muestras según sus condiciones de almacenamiento (Saigusa, et al., 2021).

2.7 Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo cumpliendo con todas las normativas éticas vigentes. La participante del estudio fue adecuadamente informada sobre los procedimientos y objetivos del estudio, y se les solicitó su consentimiento por escrito.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cada muestra de sangre, suero y plasma se tomaron 3 réplicas para extraer las intensidades de pico por masa. Es decir, 3 réplicas por cada muestra de temperatura por día por tipo. Se procedió con el procesamiento de las intensidades, aplicando escalado por Pareto. Se presentaron los análisis resumidos en grupos por tipo, por día y por temperatura.

3.1 Sangre total

Para las Figuras se consideró la siguiente etiqueta (Ejemplo: ST1H25 = ST – 1H - 25):

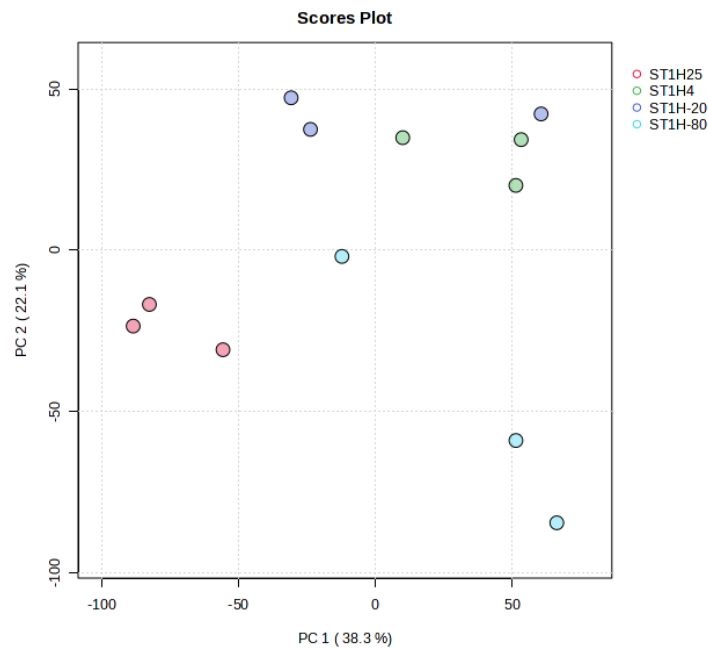
- ST: Sangre total
- 1H= 1hora, 2H = 1día, 3H = 7 días, 4H = 15 días
- 25 = 25 °C, 4 = 4 °C, -20 = -20 °C, -80 = -80 °C

3.1.1 Por día

El análisis por PCA del día 0 que compara las diferentes temperaturas muestra que los perfiles de metabolitos son similares para las muestras mantenidas a 4 °C y a -20 °C (Figura 7). El perfil de metabolitos de las muestras a 25 °C es diferente de los demás. Con respecto a las muestras mantenidas a -80 °C, se observa que hay una réplica con perfil similar a 4 °C y a -20 °C. Esta variabilidad puede estar relacionada con la temperatura o con las características de variabilidad del MALDI-TOF/MS (Kapoor et al., 2009).

Figura 7

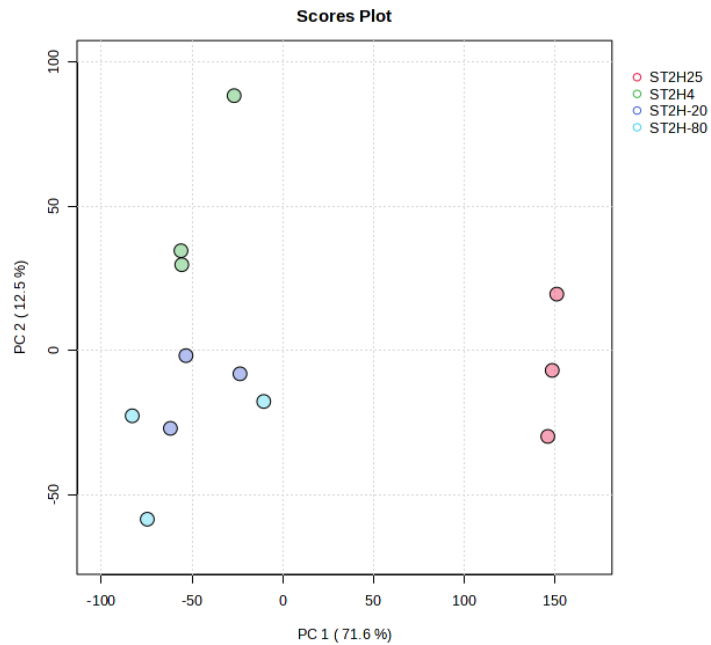
PCA por 1 hora entre grupos de temperaturas de sangre total



La comparación de las variables de temperatura en el día 1, es decir, 24h después de la toma y procesamiento de las muestras muestra que durante este período sigue existiendo una similitud de perfil de metabolitos entre las temperaturas 4 °C y a -20 °C, con mayor proximidad de perfil de metabolitos de las muestras mantenidas a -80 °C (Figura 8). Así mismo, la muestra mantenida a 25 °C posee un perfil de metabolitos diferente de las demás condiciones.

Figura 8

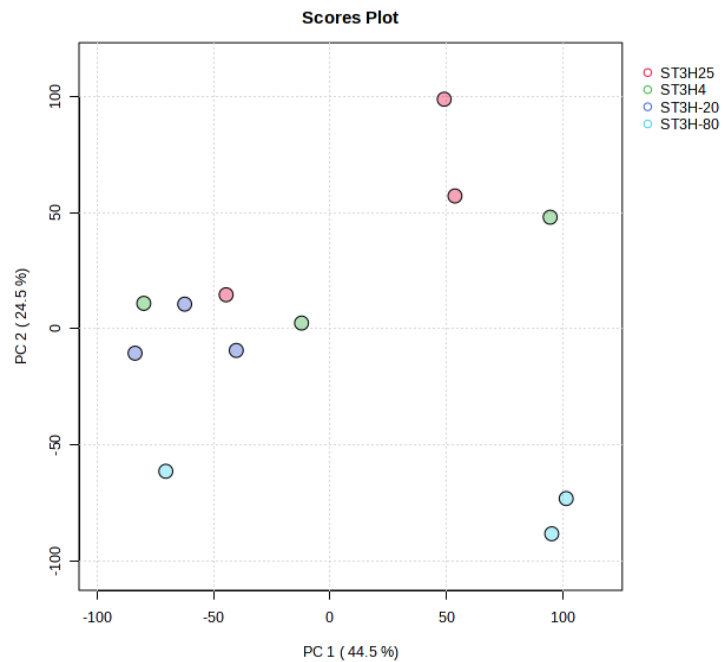
PCA por 1 día entre grupos de temperaturas de sangre total



El siguiente análisis con respecto al tiempo consideró el perfil de metabolitos después de 7 días de mantenimiento de las muestras en sus respectivas condiciones de temperaturas (Figura 9). En este período se puede observar que existe mayor variabilidad en los perfiles de diferentes temperaturas, lo que inicialmente se podría atribuir a la variabilidad de la técnica de MALDI-TOF/MS. Sin embargo, es importante resaltar el efecto del tiempo en las muestras y potencial degradación de metabolitos debido a que los metabolitos están almacenados en papel (Malsagova et al., 2020).

Figura 9

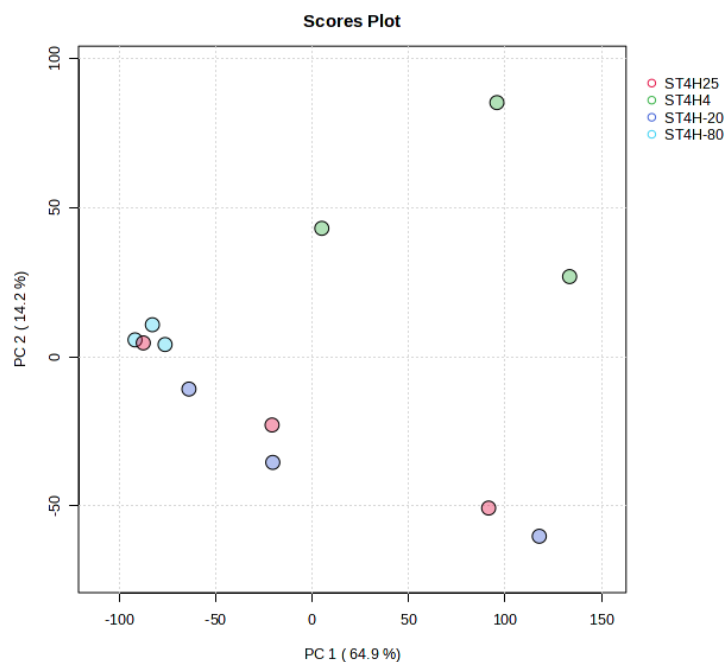
PCA por 7 días entre grupos de temperaturas de sangre total



En las mismas condiciones de temperaturas analizadas anteriormente, se realizó un análisis de perfil metabolómico después de 14 días de almacenamiento de las muestras (Figura 10). Como resultado, se puede observar que las muestras mantenidas a 4 °C presentan un perfil diferente a las demás muestras de las temperaturas de 25 °C, -20 °C y -80 °C. Es importante evidenciar que se nota una estabilidad de perfil de las muestras mantenidas a -80 °C, lo que se refleja por la proximidad de puntos en la gráfica de Score Plot del PCA.

Figura 10

PCA por 15 días entre grupos de temperaturas de sangre total

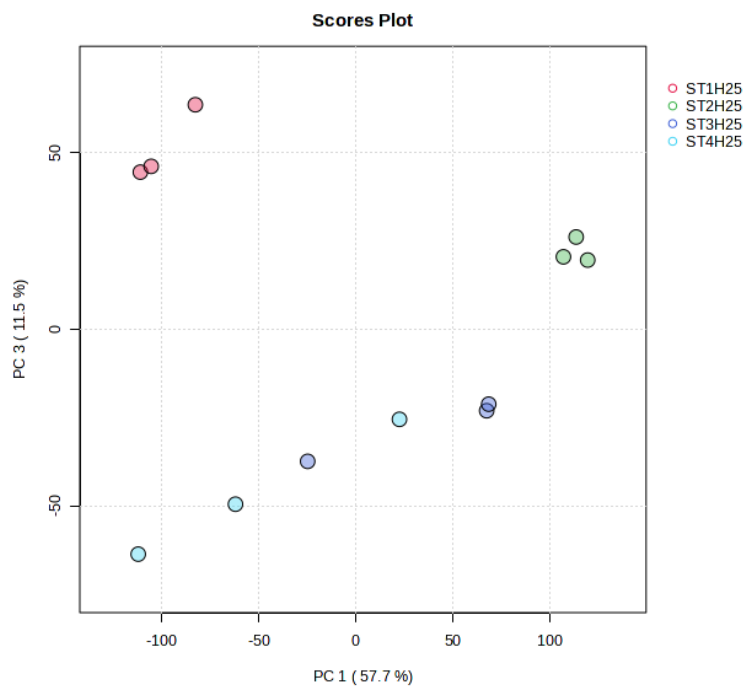


3.1.2 Por temperatura

Otra forma de evaluación del perfil de metabolitos consiste en comparar los perfiles de metabolitos manteniendo la temperatura, mientras que la variable que sufre cambio es el día de almacenamiento. Al considerar la temperatura de 25 °C, se puede observar que el perfil del día 1 es diferentes de los demás días, existiendo similitud solamente al considerar los días 7 y 14 de almacenamiento de las muestras (Figura 11). Esto puede indicar un proceso de degradación de metabolitos a lo largo del tiempo, y se sugiere hacer más estudios de la factibilidad de mantener muestras almacenadas a la temperatura ambiente por más de 24h.

Figura 11

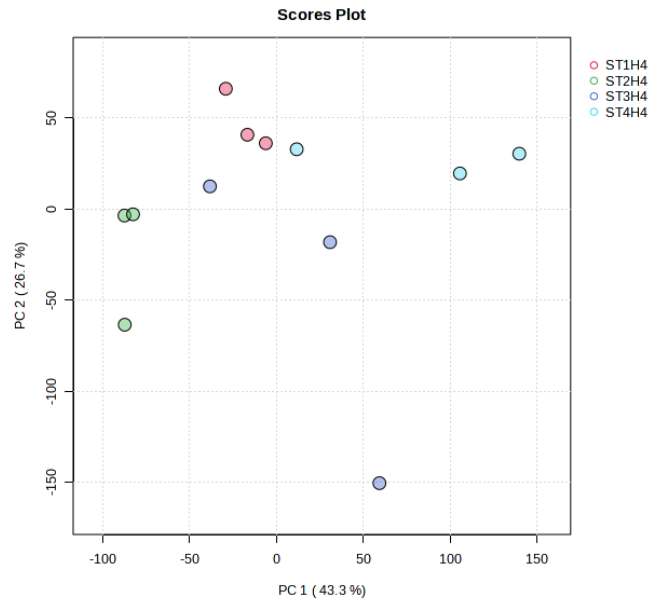
PCA por grupo de días entre 25°C temperatura de sangre total



Al analizar el perfil de metabolitos de las muestras mantenidas a 4 °C se puede obser mayor similitud de perfil metabolómico que lo observado a 25 °C (Figura 12). Sin embargo, se nota que hay mayor variabilidad de perfil para las replicas técnicas de los días 7 y 14, lo que probablemente es una variabilidad inherente a la técnica del MALDI-TOF/MS.

Figura 12

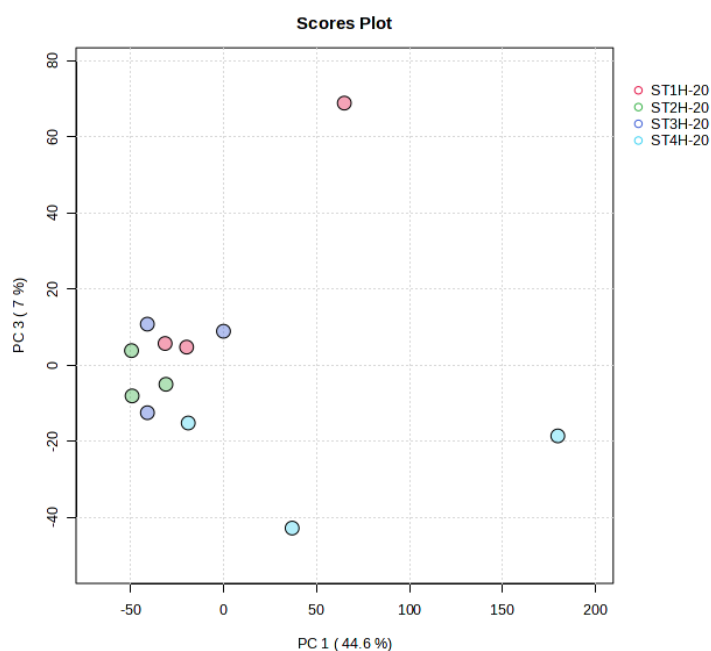
PCA por grupo de días entre 4°C temperatura de sangre total



Con respecto a las muestras mantenidas a -20°C , se observa que hay mayor uniformidad de perfil de metabolitos a esta temperatura, comparando con las temperaturas anteriores. Sin embargo, se nota la presencia de replicas técnicas consideradas outliers, es decir, que no se encajan en el patrón del perfil de metabolitos. Se considera esto una variabilidad técnica que no refleja la calidad de la muestra.

Figura 13

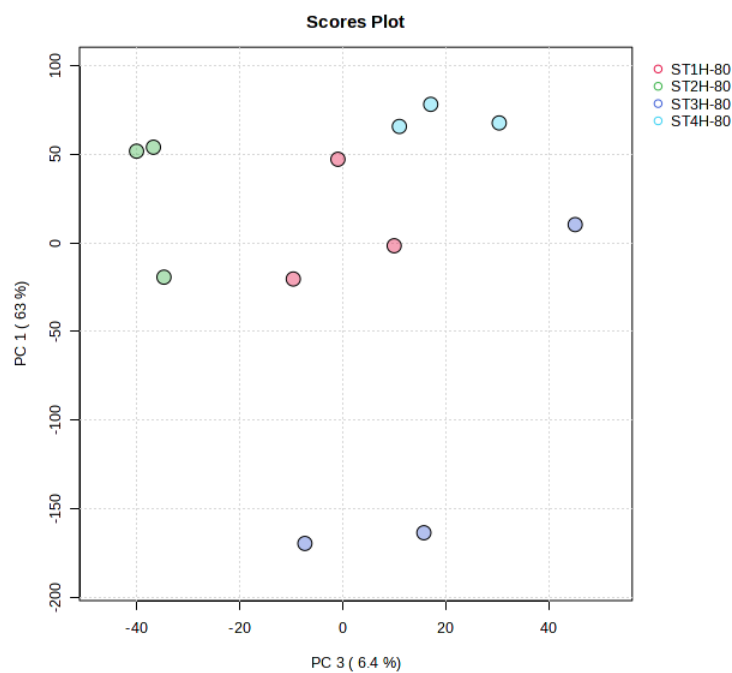
PCA por grupo de días entre -20°C temperatura de sangre total



Los datos del análisis metabolómico de las muestras mantenidas en DBS a -80 °C indican que hay similitud de perfil metabolómico para los días 0, 1 y 14 de mantenimiento de las muestra a esta temperatura (Figura 14). Hay mayor diferencia de perfil para las muestras del día 7. Esta diferencia puede estar asociada con la técnica de MALDI-TOF. Otra explicación sobre la variabilidad de perfiles en los análisis se refiere a la estabilidad de metabolitos en papel. Actualmente, los estudios presentes en la literatura científica utilizan muestras de sangre con compuestos estándares comerciales (Malsagova et al., 2020). Sin embargo, poco se sabe sobre la interacción molecular en papel filtro durante largos tiempos de almacenamiento.

Figura 14

PCA por grupo de días entre -80°C temperatura de sangre total



3.1.3 Condiciones óptimas

Luego de los resultados obtenidos a partir del análisis de los PCA por día y temperatura, se destacó que muestras de sangre pueden ser almacenadas considerando márgenes de tiempo para las distintas temperaturas.

Las temperaturas de -80 °C y -20 °C demostraron ser las más eficaces para mantener estabilidad en los perfiles metabolómicos hasta por 15 días y 7 días respectivamente, como se reflejó en la mínima variación entre los perfiles a lo largo del tiempo. Específicamente, la temperatura de -80 °C se destacó por su capacidad para conservar los perfiles sin alteraciones significativas durante todo el período evaluado, sugiriendo que esta puede ser la condición ideal para el almacenamiento a largo plazo de muestras de sangre, especialmente cuando se requiere preservar la precisión de estudios metabolómicos (Petrick, et al., 2024).

Por otro lado, las muestras almacenadas a 4 °C y 25 °C mostraron variaciones más marcadas en los perfiles metabolómicos, lo que indico una degradación potencial o alteraciones debido a las condiciones de almacenamiento menos frías. A los 7 días, los perfiles a 25 °C empiezan a estabilizarse, aunque esta temperatura ya había mostrado signos de alteración desde el primer día. La temperatura de 4 °C, aunque similar a -20 °C y 25 °C en ciertos momentos, exhibió inconsistencias que podrían ser atribuidas a errores en la extracción o en la estabilidad durante el almacenamiento. Por lo tanto, para minimizar los riesgos de alteración metabólica los 4 °C se pueden usar hasta antes del primer día del almacenamiento y las muestras de 25 °C debería tener el análisis antes de la hora.

3.2 Suero

Para las Figuras se consideró la siguiente etiqueta (Ejemplo: S0_25 = S - 0 - 25):

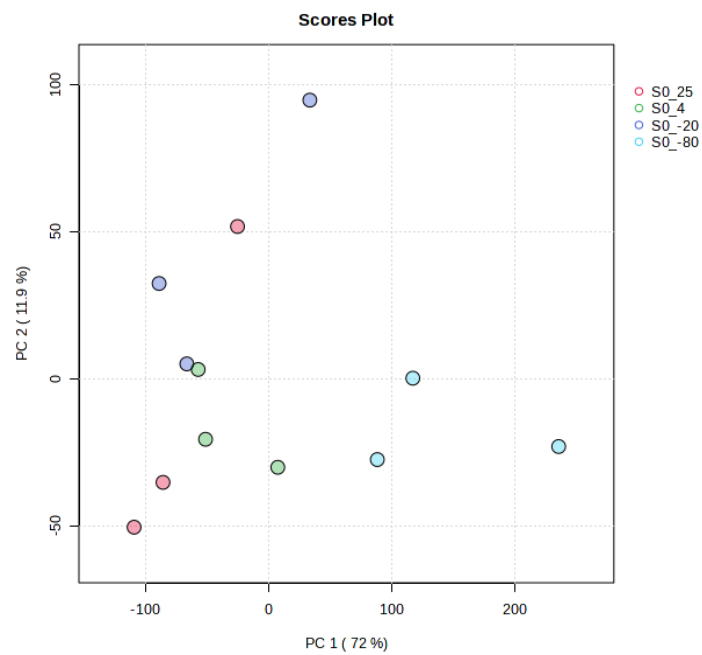
- S: Suero
- 0 = 1hora, 1 = 1dia, 7= 7 días, 15= 15 días
- 25 = 25 °C, 4 = 4 °C, -20 = -20 °C, -80 = -80 °C

3.2.1 Por día

En la Figuras 15, se observó una degradación y variación de los perfiles de temperatura. Las temperaturas -20 °C, -4 °C y 25 °C, se asocian entre si y el grupo -80 °C difiere del resto de temperatura en la hora 0.

Figura 15

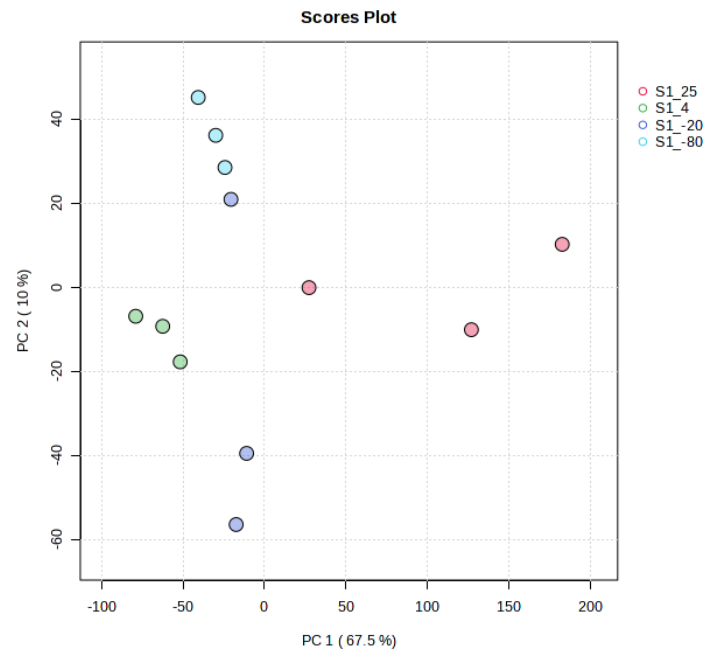
PCA por 1 hora entre grupos de temperaturas de suero



En las Figuras 16, se observó una degradación y variación de los perfiles de temperatura. Las temperaturas difieren entre sí. Lo que indico una fuerte variación en el día 1 entre los perfiles, sin embargo, la temperatura -80 °C se comprobó que se mantiene viendo los gráficos por temperatura.

Figura 16

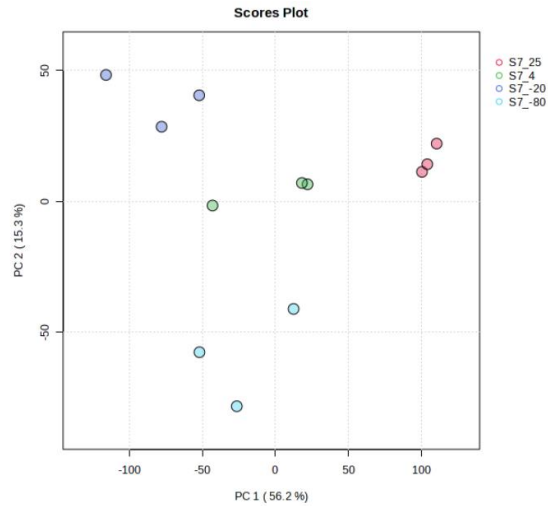
PCA por 1 día entre grupos de temperaturas de suero



En la Figura 17, se observó una degradación y variación de los perfiles de temperatura. Las temperaturas difieren entre sí. Lo que indico una fuerte variación en el día 7 entre los perfiles, sin embargo, la temperatura -80 °C se comprobó que se mantiene viendo los gráficos por temperatura.

Figura 17

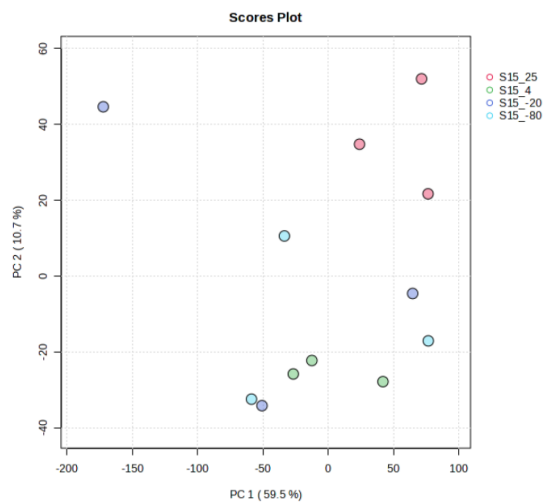
PCA por 7 días entre grupos de temperaturas de suero



En la Figura 18, resultó en la convergencia de los perfiles de -80 °C, -20 °C y 4 °C al día 15. Lo que se destacó, es la diferencia de degradación o alteración en el perfil de 25 °C desde el inicio del almacenamiento.

Figura 18

PCA por 15 días entre grupos de temperaturas de suero



3.2.2 Por temperatura

En la Figura 19 y 20, se obtuvieron perfiles metabolómicos similares de la temperatura de 25 °C y 4 °C entre la hora 1 y día 1 y entre el día 7 y día 15. Lo que significó, una independiente alteración continua a través del tiempo de los perfiles.

Figura 19

PCA por grupo de días entre 25 °C temperatura de suero

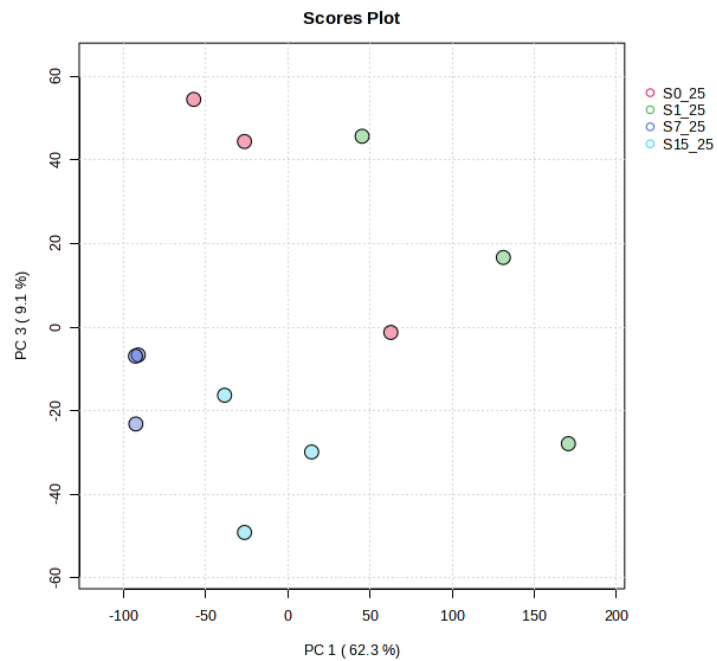
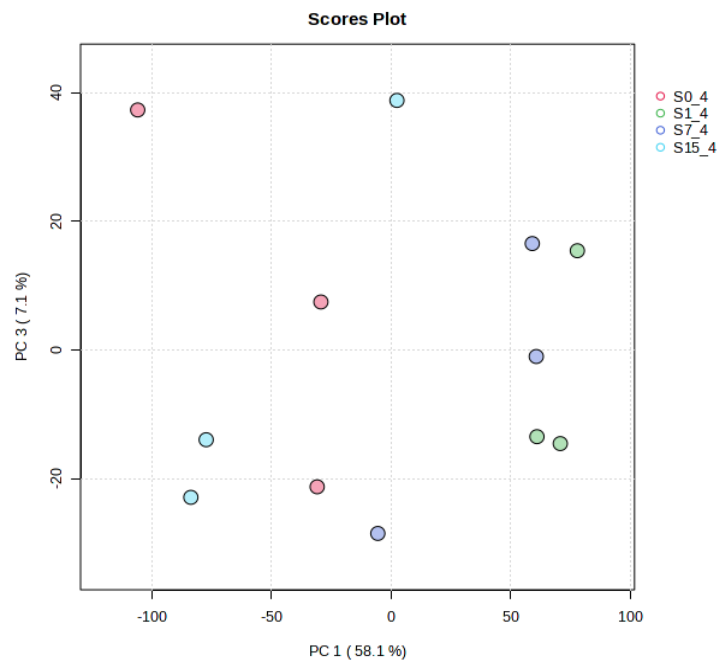


Figura 20

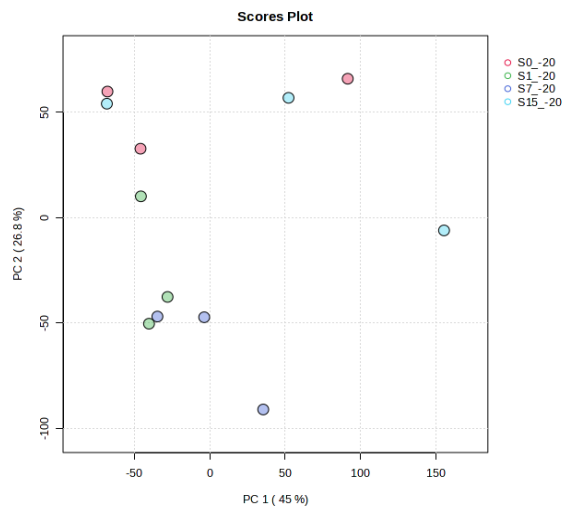
PCA por grupo de días entre 4 °C temperatura de suero



La Figura 21, demostró similitudes en los perfiles de -20 °C entre el la hora 1, día 1 y día 7. Lo que expone, una conservación hasta el día 7. Sin embargo, no es seguro, ya que, el grafico por día difiere entre los grupos -20 °C y -80 °C, el cual, esta última temperatura presento mayor estabilidad.

Figura 21

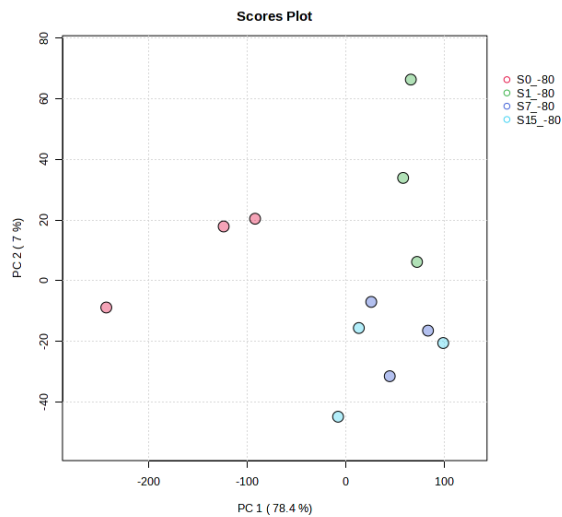
PCA por grupo de días entre -20 °C temperatura de suero



La Figura 22, se presentó a -80 °C con condiciones de temperatura más estable, ya que, los perfiles de los días 1, 7 y 15 se mantuvieron cercanos. Lo que podría indicar, según bibliografía y experimentación, la conservación de metabolitos a -80 °C, a la hora 1 difiere.

Figura 22

PCA por grupo de días entre -80 °C temperatura de suero



3.2.3 Condiciones óptimas

Luego de los resultados obtenidos a partir del análisis de los PCA por día y temperatura, se destacó que muestras de suero pueden ser almacenadas considerando márgenes más limitados tiempo para las distintas temperaturas.

En general, observo que la temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ es claramente superior en términos de conservación de metabolitos a lo largo del tiempo. Los análisis realizados en las gráficas demuestran que, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los perfiles metabolómicos se mantuvieron consistentes y cercanos entre sí en los días 1, 7 y 15 de almacenamiento, lo que reflejaron una alta estabilidad y mínima degradación metabólica. Esto sugirió que la temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ es la más adecuada para el almacenamiento a largo plazo de suero, manteniendo la integridad de los metabolitos y asegurando la reproducibilidad de los análisis metabolómicos (Petrick, et al., 2024).

Por otro lado, las temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostraron una variabilidad más significativa en los perfiles metabolómicos, indicando una degradación continua independiente de la temperatura durante el almacenamiento. Aunque a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa cierta conservación hasta el día 7, la estabilidad no se mantiene a largo plazo, especialmente en comparación con $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que no da claridad en su uso. Las temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque muestran perfiles similares en intervalos cortos entre la hora 1 y día 1, y entre el día 7 y 15, también presentan signos de alteración metabólica desde el inicio.

3.3 Plasma

Para las Figuras se consideró la siguiente etiqueta (Ejemplo: P0_25 = P - 0 - 25):

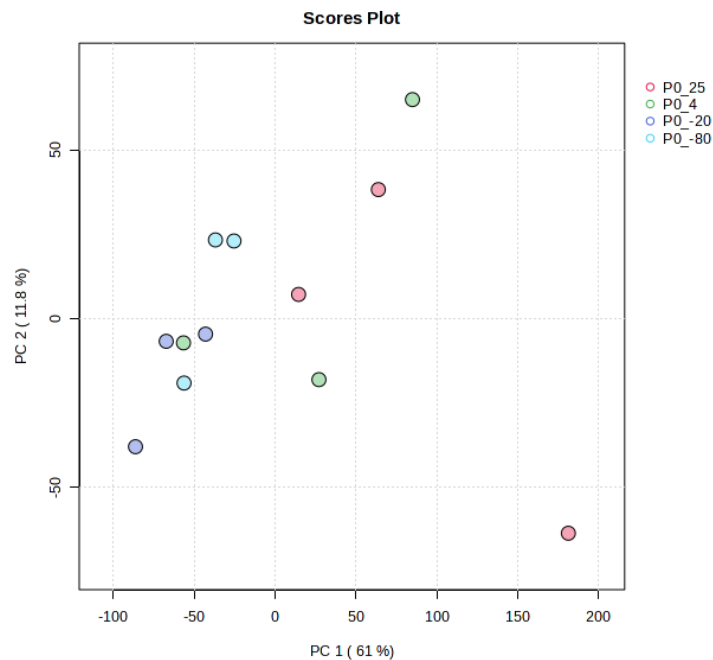
- P: Plasma
- 0 = 1hora, 1 = 1dia, 7= 7 días, 15= 15 días
- 25 = $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 = $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, -20 = $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, -80 = $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.3.1 Por día

En la Figura 23, se observó que los perfiles metabolómicos en las distintas temperaturas se mantienen similares dentro de la primera hora de análisis, a excepción, de la temperatura de 25 °C.

Figura 23

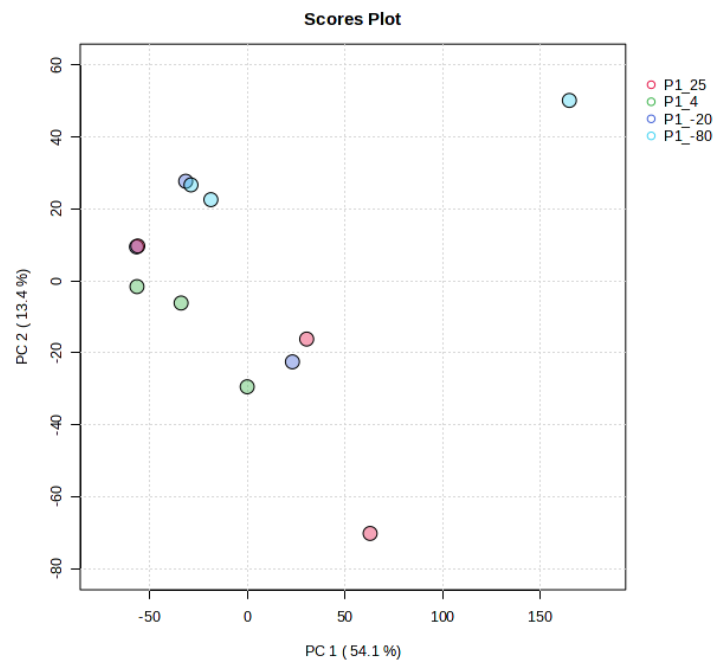
PCA por 1 hora entre grupos de temperaturas de plasma



En la Figura 24, se obtuvieron que los grupos que se mantenían cercanos al primer día serían las temperatura de 4, -20 y -80 °C. Esto indicó que las bajas temperaturas contribuyen a una mayor estabilidad metabólica de las muestras, limitando los cambios que podrían ocurrir a temperaturas más altas. Por otro lado, las muestras mantenidas a 25 °C se encuentran más dispersas y aisladas en el gráfico, lo que podría reflejar una mayor variabilidad metabólica y menor estabilidad bajo estas condiciones más cálidas.

Figura 24

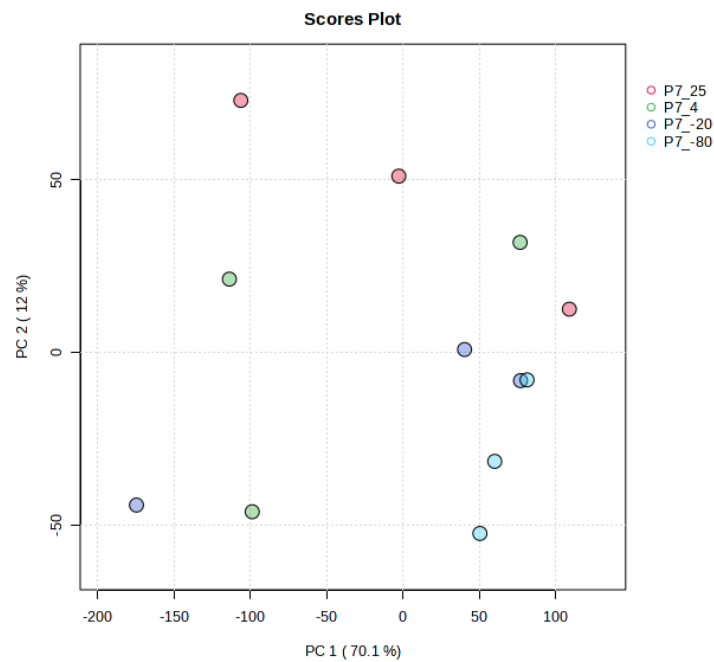
PCA por 1 día entre grupos de temperaturas de plasma



Posteriormente, en la Figura 25, mostro similitudes los perfiles de temperatura de -20°C y -80°C a los 7 días. En cuanto a las temperaturas analizadas, 4°C y 25°C , el gráfico muestra patrones distintos de dispersión en comparación con las temperaturas más frías de -20°C y -80°C . En la Figura 26, los puntos asociados a 4°C se observan ligeramente agrupados cerca del centro del gráfico, pero no tan cerca como los de -20°C y -80°C , indicando una posible estabilidad.

Figura 25

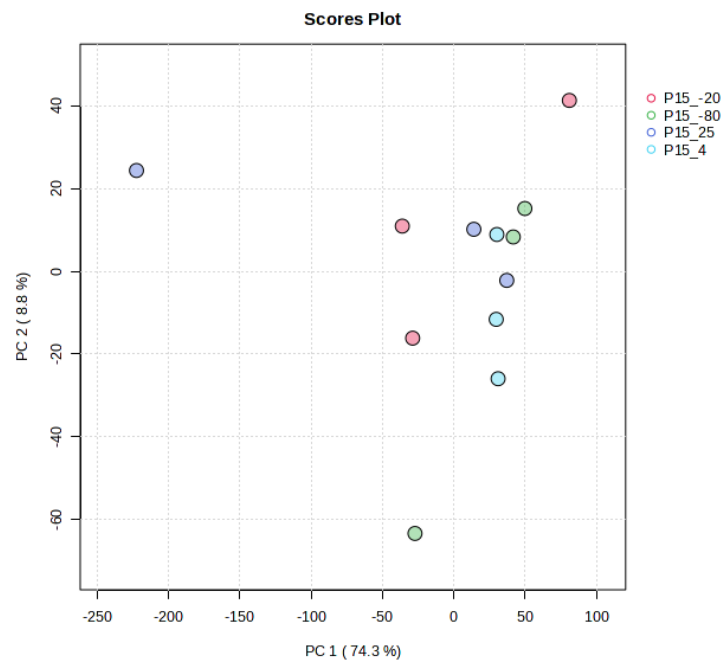
PCA por 7 días entre grupos de temperaturas de plasma



A los 15 días, en la Figura 26, los puntos representativos de cada temperatura de almacenamiento 25 °C, 4 °C, -20 °C, y -80 °C mostraron una cercanía relativa entre sí, pero no forman agrupaciones tan definidas como en observaciones anteriores. Esta proximidad general sugiere que a medida que pasa el tiempo, las diferencias en los perfiles metabólicos de las muestras tienden a converger, posiblemente debido a una pérdida gradual de estabilidad metabólica en todas las condiciones de temperatura.

Figura 26

PCA por 15 días entre grupos de temperaturas de plasma

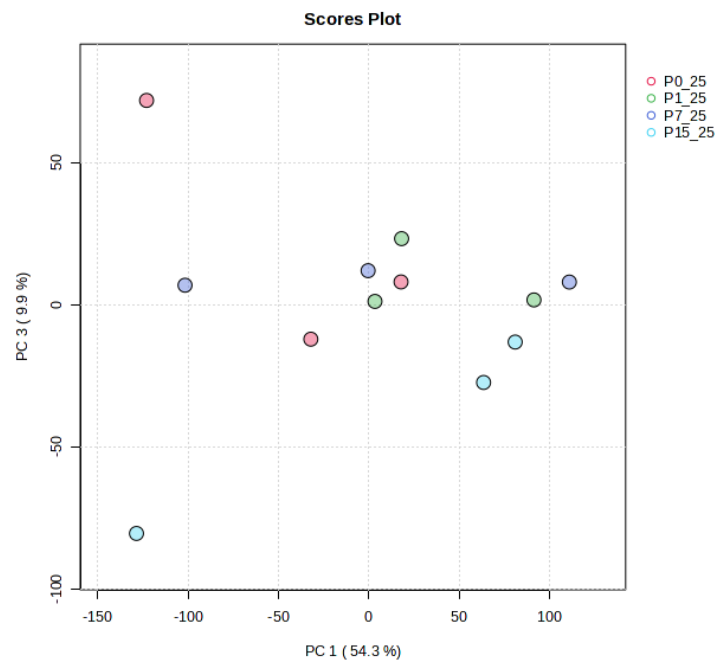


3.3.2 Por temperatura

En las condiciones iniciales, en la Figura 27, se demostró que la temperatura a 25 °C no muestra una estabilidad a lo largo de los días, ni desde la primera hora. Se observó unas similitudes entre los perfiles.

Figura 27

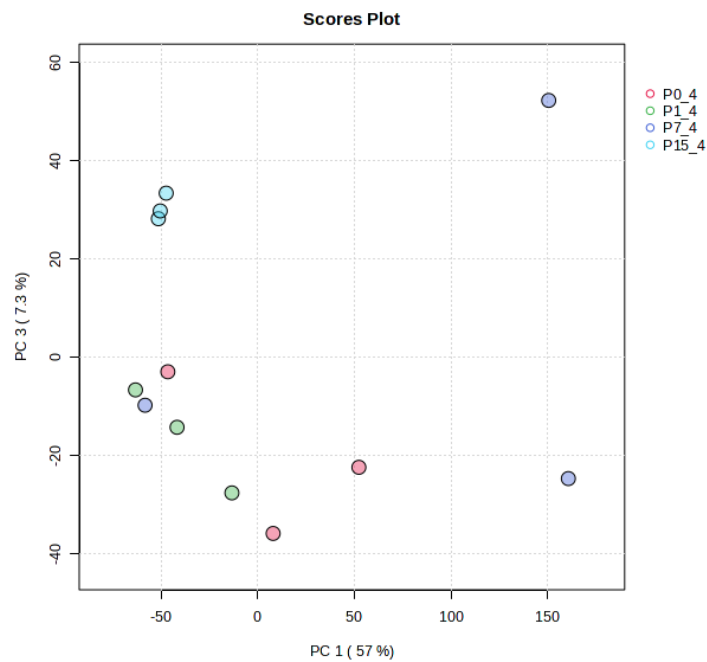
PCA por grupo de días entre 25 °C temperatura de plasma



Por otro lado, el grupo de 4 °C difieren a partir del día 1, mostro una estabilidad hasta el primer día (Figura 28). Las muestras al día inicial (0 días) y al primer día (1 día) presentaron una cercanía notable, indicando que el perfil metabólico se mantuvo relativamente estable durante las primeras 24 horas. Sin embargo, a partir de este punto inicial, las muestras mostraron una tendencia a dispersarse más en el gráfico en los días 7 y 15, sugiriendo una progresiva divergencia en los perfiles metabólicos con el tiempo.

Figura 28

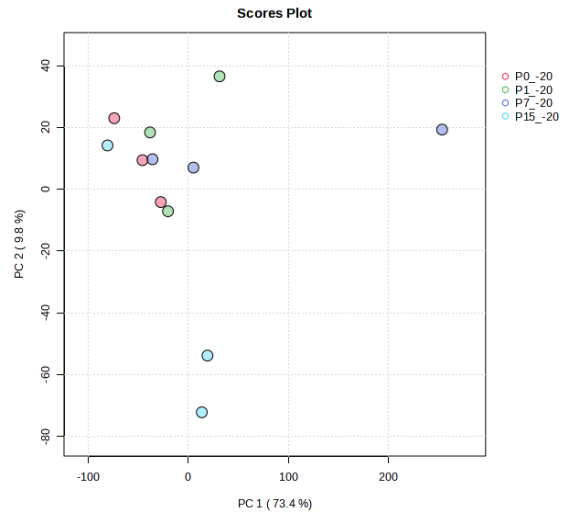
PCA por grupo de días entre 4 °C temperatura de plasma



En la Figura 29, denoto estabilidad del grupo de -20 °C hasta el día 7 comparando perfiles. En este análisis, las muestras mantenidas a -20 °C exhibieron una agrupación cercana entre los puntos correspondientes a los días 0, 1 y 7, lo que indicó una estabilidad notable en los perfiles metabólicos de las muestras durante la primera semana. Sin embargo, al día 15, se observa una divergencia significativa en la posición de los puntos en el gráfico, especialmente con el punto azul, que se desplaza considerablemente hacia el extremo derecho. Esto indica que, a pesar de la estabilidad inicial, se empezaron a manifestar cambios metabólicos más pronunciados después de una semana.

Figura 29

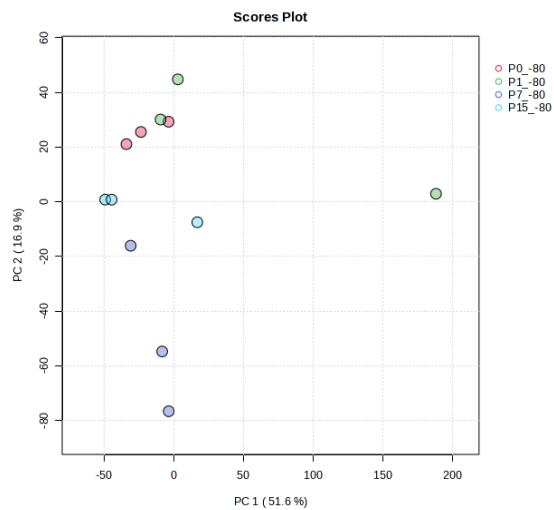
PCA por grupo de días entre -20 °C temperatura de plasma



Por último, la Figura 30, resultado que a través de los días se presentó una similitud en perfiles de -80 °C hasta antes del día 15. Que indico como una estabilidad en la temperatura -80 °C como grupo clave para almacenamiento.

Figura 30

PCA por grupo de días entre -80 °C temperatura de plasma



3.3.3 Condiciones óptimas

Luego de los resultados obtenidos a partir del análisis de los PCA por día y temperatura, se destacó que muestras de plasma pueden ser almacenadas considerando márgenes más limitados de tiempo para las distintas temperaturas.

se observó que las temperaturas más bajas ofrecen mejores resultados. En la primera hora de análisis, las temperaturas de 4 °C, -20 °C y -80 °C mostraron perfiles similares, con una buena estabilidad inicial. Conforme avanzaba el tiempo, tanto a -20 °C como a -80 °C se mantuvieron similares hasta el día 7, destacándose especialmente -80 °C por su consistencia y estabilidad a largo plazo. Los análisis hasta el día 15 en -80 °C siguió mostrando el mayor grado de estabilidad comparativa. Mientras que, -20 °C ofrecería una estabilidad consistente hasta el día 7 (Petrick, et al., 2024).

Por otro lado, la temperatura de 25 °C demostró ser inadecuada para el almacenamiento de plasma, ya que no mantuvo la estabilidad desde la primera hora ni a lo largo de los días subsiguientes. La temperatura de 4 °C, aunque inicialmente estable hasta el primer día, empezó a diferir y mostró inestabilidad a partir del día 1.

3.4 Consideraciones para protocolo de almacenamiento

El protocolo de almacenamiento de muestras biológicas deberá diseñarse para maximizar la preservación de la integridad de las muestras y asegurar la validez de los análisis posteriores, especialmente en estudios que involucran biomarcadores para diagnósticos y seguimientos clínicos. Las consideraciones para el almacenamiento de plasma, suero y sangre, basadas en los estudios, literatura revisada y el presente estudio, se presentan a continuación (Fischer et al., 2019).

3.4.1 Temperatura de almacenamiento

- **Sangre:** La sangre entera debe ser procesada lo más pronto posible tras su recolección para separar los componentes deseados (plasma, suero, células). Las células sanguíneas pueden ser almacenadas a 4 °C por un periodo corto (hasta 1 día) antes de su procesamiento o análisis. Similar, utilizar -20 °C y -80 °C para almacenamiento hasta 1 y hasta 4 semanas, respectivamente.
- **Suero y Plasma:** La evidencia indica que las temperaturas de -80 °C son ideales para el almacenamiento de plasma y suero entre 1 semana a 2 semanas), minimizando la degradación de los metabolitos y la actividad enzimática. Para períodos más cortos, hasta una semana, se puede considerar el uso de -20 °C, aunque con ciertas limitaciones en la estabilidad de algunos biomarcadores. Se puede considerar únicamente en condiciones estable, temperaturas de 4 °C hasta menos 1 día de almacenamiento.

3.4.2 Preparación y procesamiento de las muestras

Idealmente las muestras deben ser procesadas rápidamente después de la recolección para evitar la degradación metabólica. Es crucial centrifugar la sangre a la temperatura recomendada por los protocolos de laboratorio para separar el plasma y el suero, y transferir estos componentes a un nuevo contenedor para su congelación y almacenamiento. Se deberá utilizar técnicas asépticas durante el manejo y preparación de las muestras para evitar contaminaciones que puedan afectar los resultados de los análisis (Fischer et al., 2019).

3.4.3 Control de calidad y monitoreo

Siempre y cuando sea posible implementar un sistema robusto de monitoreo de temperatura y anotaciones de tiempo y corregir desviaciones que puedan comprometer la integridad de las muestras. Además, se podrá controlar la estabilidad de las muestras utilizando controles a -80 °C de estabilidad en el tiempo de almacenamiento (Malsagova et al., 2020). Realizar controles de calidad regulares para evaluar la estabilidad de los biomarcadores y ajustar los protocolos de almacenamiento si es necesario.

3.4.4 Documentación rigurosa

En general, se debe documentar, al menos, el paso a paso desde la recolección hasta el almacenamiento, incluyendo fechas, hora exacta, condiciones de procesamiento, y cualquier incidencia que pueda influir en la calidad de las muestras. Esto para tener un mejor criterios de análisis y poder interpretar cualquier resultado si se vio influenciado o ajustar el protocolo. Mantener un sistema de codificación y registro que permita la fácil identificación, trazabilidad de cada muestra y comunicación de los involucrados.

3.4.5 Consideraciones específicas para estudios metabolómicos

Siempre considerar una posible incidencia de las condiciones (Fomenko et al., 2022). Estudios previos sugieren que variaciones en el almacenamiento pueden alterar significativamente los perfiles metabolómicos, afectando los resultados finales del análisis. Por lo que, se deberá mantener actualizado con futuras investigaciones (Petrick, et al., 2024).

Se prefiere la validación los métodos de almacenamiento en la medida de lo posible mediante estudios piloto que evalúen cómo las diferentes condiciones afectan los biomarcadores de interés, particularmente en estudios de diagnóstico y pronóstico clínico locales o focalizados (Cécile Martias et al., 2021).

La implementación de estas consideraciones ayudará a garantizar que las muestras biológicas se mantengan en condiciones óptimas, preservando su utilidad para diagnósticos precisos, efectivos y personalizados. Es fundamental que todos los involucrados en el manejo de muestras biológicas estén adecuadamente capacitados y que los protocolos estén actualizados para reflejar las mejores prácticas y tecnologías disponibles.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se analizó la estabilidad del perfil metabolómico de muestras de sangre en Dried Blood Spot (DBS) para comprender cómo las variaciones en la temperatura y el tiempo de almacenamiento influyen en la integridad de los metabolitos, utilizando espectrometría por MALDI-TOF. Este análisis permitió abordar los objetivos específicos propuestos al inicio del estudio, ofreciendo resultados significativos que tienen implicaciones prácticas para la recolección y almacenamiento de muestras en investigaciones clínicas y epidemiológicas.

Se comparó la estabilidad de los perfiles metabolómicos entre distintas condiciones de almacenamiento. Dando lugar a que, la temperatura de almacenamiento ejerce un impacto significativo en la estabilidad de los metabolitos en las muestras DBS. Las muestras de sangre almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantuvieron su estabilidad metabolómica durante el período evaluado de 15 días, mostrando mínimas variaciones en los perfiles metabolómicos. En contraste, las muestras almacenadas a temperaturas de congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) exhibieron una estabilidad reducida, con una degradación notable de ciertos metabolitos críticos después de solo una semana y un día respectivamente.

Por otro lado, los perfiles metabolómicos de las muestras almacenadas a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) sufrieron alteraciones significativas en un periodo corto, lo cual destaca la susceptibilidad de los metabolitos a la degradación en condiciones no controladas. Estos hallazgos sugieren que para estudios a largo plazo o de envío a larga distancia (más de 1 día), es crucial mantener las muestras a temperaturas de ultracongelación o congelación para preservar la integridad de los datos.

Se comprobó a la técnica de DBS como un método eficiente para la recolección de muestras de sangre, particularmente en contextos donde la accesibilidad a infraestructura de refrigeración es limitada. Gracias a su simplicidad y coste reducido, los DBS se presentan como una solución viable para la recolección de muestras en estudios de gran escala y en ubicaciones remotas. La capacidad de las tarjetas DBS para mantener la estabilidad de los metabolitos bajo condiciones de ultracongelación (-80 °C) y congelación (-20 °C) las hace particularmente útiles para estudios internacionales en los que las muestras deben ser transportadas a largas distancias y almacenadas por periodos prolongados. Asimismo, este método de muestreo permite una reducción significativa en los costos y complejidad logística asociados con el manejo de muestras biológicas, facilitando su adopción en una variedad más amplia de entornos de investigación. Adicionando consideraciones para el desarrollo de protocolos como hojas de rutas, establecimiento de tiempos hasta el análisis, controles de calidad, entre otros.

4.2 Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en este estudio sobre la estabilidad de los perfiles metabolómicos de muestras de sangre en DBS bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo, se dictan varias recomendaciones para prácticas futuras y direcciones de investigación. Las recomendaciones están diseñadas para mejorar la efectividad y fiabilidad de investigación relacionadas al muestreo por DBS y metabolómico especialmente en contextos clínicos y epidemiológicos donde la precisión y la reproducibilidad de los datos son cruciales.

4.2.1 Establecimiento de protocolos de almacenamiento estrictos

Utilizar controles rigurosos de la temperatura, se garantiza que las variaciones en la composición metabolómica debido al decaimiento o alteración de los metabolitos sean mínimas.

Para aumentar la fiabilidad de estudios que dependen de la identificación precisa de biomarcadores para diagnósticos o evaluación epidemiológica.

4.2.2 Implementación de DBS

Realizar la implementación de la técnica de DBS en áreas remotas o recursos limitados para fomentar la investigación clínica y epidemiológica. Para poder seguir recopilando datos más representativos de diversas poblaciones. Las capacitaciones y la difusión de buenas prácticas incrementan la uniformidad en la recolección y procesamiento de muestras a nivel global, lo cual es esencial para estudios comparativos y multicéntricos.

4.2.3 Desarrollo de mejores prácticas y estándares

Al establecer guías basadas en evidencia científica rigurosa, preservando la personalización según el contexto, pero estableciendo estándares básicos que pueden ser universalmente aplicados para mejorar la calidad de los datos recopilados. Así, reduciendo la variabilidad entre estudios y facilitando la comparabilidad de los resultados. Agregar

4.2.4 Extender la investigación sobre la estabilidad de biomarcadores

Al expandir la investigación para incluir una gama más amplia de biomarcadores, se puede seguir evaluando la aplicabilidad de DBS en diversos campos de estudio, desde enfermedades infecciosas hasta trastornos metabólicos, permitiendo una brecha de estabilidad menor, pero conservando la fiabilidad del diagnóstico. Los estudios que analicen la estabilidad proporcionarán información crítica que puede ser utilizada para fortalecer los protocolos de almacenamiento y manejo de muestras, asegurando que los resultados sean robustos y replicables.

BIBLIOGRAFÍA

Clish, C. B. (2015). Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies*, 1(1), a000588–a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>

Cécile Martias, Baroukh, N., Mavel, S., Blasco, H., Lefèvre, A., Roch, L., Montigny, F., Gatien, J., Schibler, L., Dufour-Rainfray, D., Lydie Nadal-Desbarats, & Emond, P. (2021). Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. *Molecules*, 26(14), 4111–4111. <https://doi.org/10.3390/molecules26144111>

Chen, Y., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4), 357–357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>

Coelho, M., Raposo, L., Goodfellow, B. J., Atzori, L., Jones, J., & Manadas, B. (2020). The potential of metabolomics in the diagnosis of thyroid cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 15, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21155272>

Delahaye, L., Veenhof, H., Birgit, Alffenaar, J.-W. C., Linden, R., & Stove, C. (2021). Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples: State-of-the-Art. *Therapeutic Drug Monitoring*, 43(3), 310–321. <https://doi.org/10.1097/ftd.0000000000000864>

Fischer, S., Obrist, R., & Ehlert, U. (2019). How and when to use dried blood spots in psychoneuroendocrinological research. *Psychoneuroendocrinology*, 108, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.06.011>

Fomenko, M. V., Yanshole, L. V., & Tsentalovich, Y. P. (2022). Stability of Metabolomic Content during Sample Preparation: Blood and Brain Tissues. *Metabolites*, 12(9), 811–811. <https://doi.org/10.3390/metabo12090811>

Freeman, J. D., Rosman, L. M., Ratcliff, J. D., Strickland, P. T., Graham, D. R., & Silbergeld, E. K. (2018). State of the Science in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*, 64(4), 656–679. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275966>

Gupta, K., & Mahajan, R. (2018). Applications and diagnostic potential of dried blood spots. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 8(1), 1–1. https://doi.org/10.4103/ijabmr.ijabmr_7_18

Hasan, M. R., Suleiman, M., & Pérez-López, A. (2021). Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of COVID-19. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.721556>

Industrias Químicas y Biológicas. (2024). BD Vacutainer. Bioquímica Médica S. de R.L de C.V. <https://industriasquimicasybiologicas.com/bd-vacutainer/>

Kapoor, R., Ladak, S. S., & Virendra Gomase. (2009, December 30). MALDI-TOF based Metabolomic approach. ResearchGate; Bioinfo Publications. https://www.researchgate.net/publication/47347985_MALDI-TOF_based_Metabolomic_approach

Li, K., Naviaux, J. C., Monk, J. M., Wang, L., & Naviaux, R. K. (2020). Improved dried blood spot-based metabolomics: A targeted, broad-spectrum, single-injection method. *Metabolites*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/metabo10030082>

Lim, C. T. (2020, March 23). Future of health diagnostics. ResearchGate; Wiley. https://www.researchgate.net/publication/340098074_Future_of_health_diagnostics

Lins Neto, M. Á. de F., Verdi, G. M. X., Veras, A. de O., Veras, M. de O., Caetano, L. C., & Ursulino, J. S. (2020). Use of metabolomics to the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Arquivos de Gastroenterologia*, 57(3), 311–315. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.202000000-57>

Liu, Y., Zhan, L., Qin, Z., Sackrison, J., & Bischof, J. C. (2021). Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis. In *ACS Nano* (Vol. 15, Issue 3, pp. 3593–3611). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10035>

Luo, X., Liu, J., Wang, H., & Lu, H. (2020). Metabolomics identified new biomarkers for the precise diagnosis of pancreatic cancer and associated tissue metastasis. *Pharmacological Research*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104805>

Malsagova, K., Artur Kopylov, Stepanov, A., Butkova, T., Izotov, A., & Kaysheva, A. (2020). Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics*, 10(4), 248–248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>

Malsagova, K., Artur Kopylov, Stepanov, A., Butkova, T., Izotov, A., & Kaysheva, A. (2020). Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics*, 10(4), 248–248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>

Moat, S. J., George, R. S., & Carling, R. S. (2020). Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. In *International Journal of Neonatal Screening* (Vol. 6, Issue 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijns6020026>

Odom, J. D., & Sutton, V. R. (2021). Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. In *Clinical Chemistry* (Vol. 67, Issue 12, pp. 1606–1617). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab184>

Petrick, L., Imani, P., Perttula, K., Yano, Y., Whitehead, T., Metayer, C., Schiffman, C., Dolios, G., Dudoit, S., & Rappaport, S. (2021). Untargeted metabolomics of newborn dried blood spots reveals sex-specific associations with pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 106, 106585–106585. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106585>

Pumford, E. A., Lu, J., Spaczai, I., Prasetyo, M. E., Zheng, E. M., Zhang, H., & Kamei, D. T. (2020). Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>

Raffone, A., Troisi, J., Boccia, D., Travaglino, A., Capuano, G., Insabato, L., Mollo, A., Guida, M., & Zullo, F. (2020). Metabolomics in endometrial cancer diagnosis: A systematic review. In *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* (Vol. 99, Issue 9, pp. 1135–1146). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/aogs.13847>

Roessner, U., & Bowne, J. (2009). What is metabolomics all about? *BioTechniques*, 46(5), 363–365. <https://doi.org/10.2144/000113133>

Saigusa, D., Matsukawa, N., Hishinuma, E., & Koshiha, S. (2021). Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics. In *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (Vol. 37). Japanese Society for the Study of Xenobiotics. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.11.008>

Shah, S. H., Kraus, W. E., & Newgard, C. B. (2012). Metabolomic Profiling for the Identification of Novel Biomarkers and Mechanisms Related to Common Cardiovascular Diseases. *Circulation*, 126(9), 1110–1120. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.060368>

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

Thore Buergele, Steinfeldt, J., Ruyoga, G., Maik Pietzner, Bizzarri, D., Vojinovic, D., Upmeier, J., Loock, L., Kittner, P., Christmann, L., Hollmann, N., Henrik Strangalies, Braunger, J. M., Wild, B., Chiesa, S. T., Spranger, J., Klostermann, F., Erik, Trompet, S., & Mooijaart, S. P. (2022). Metabolomic profiles predict individual multidisease outcomes. *Nature Medicine*, 28(11), 2309–2320. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01980-3>

Wang, C., Liu, M., Wang, Z., Li, S., Deng, Y., & He, N. (2021). Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. In *Nano Today* (Vol. 37). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>

Xue, P., Zhang, L., Xu, Z., Yan, J., Gu, Z., & Kang, Y. (2018). Blood sampling using microneedles as a minimally invasive platform for biomedical diagnostics. *Applied Materials Today*, 13, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.08.013>

Yang, L., Wang, Y., Cai, H., Wang, S., Shen, Y., & Ke, C. (2020). Application of metabolomics in the diagnosis of breast cancer: A systematic review. In *Journal of Cancer* (Vol. 11, Issue 9, pp. 2540–2551). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/jca.37604>

Zhang, X., Takeuchi, T., Takeda, A., Mochizuki, H., & Nagai, Y. (2022). Comparison of serum and plasma as a source of blood extracellular vesicles: Increased levels of platelet-derived particles in serum extracellular vesicle fractions alter content profiles from plasma extracellular vesicle fractions. *PLoS ONE*, 17(6 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270634>

ANEXO

Detalle materiales

- Microtubos de 2 ml: Se prepararon 96 microtubos para la extracción de metabolitos. Estos tubos fueron rotulados con antelación para evitar errores durante el procesamiento de las muestras.
- Tiras de Papel Filtro Whatman 1: Se emplearon 48 tiras de papel filtro, cada una rotulada de manera clara para identificar las muestras de sangre total, plasma y suero.
- Instrumentos de Escritura: Se usaron lápices para escribir en el papel filtro y marcadores para los tubos, asegurando que la información permaneciera legible a lo largo del experimento.
- Pipetas y Puntas de Variados Volúmenes: pipetas y puntas de 1000ul y 10ul
- Materiales de Extracción: Aguja de venopunción para la toma de muestras de sangre, 1 tubo con EDTA para evitar la coagulación y 2 tubos secos para la recolección de plasma y suero.
- Equipos de Centrifugación: Se utilizaron dos centrifugas, una para tubos de sangre y otra para microtubos, para separar los componentes sanguíneos.
- Materiales de Limpieza y Seguridad: Etanol al 70% y cloro al 1% para la desinfección, junto con guantes de nitrilo para garantizar la seguridad del personal y la limpieza del entorno experimental.
- Cajas de Almacenamiento de Muestras: Cuatro cajas para mantener las muestras organizadas y protegidas durante el almacenamiento y transporte.

A continuación, se muestra un resumen de los implementos utilizado hasta la extracción de metabolitos

Tabla 2*Insumos empleados hasta la extracción de metabolitos*

Material (insumos / equipos)	Cantidad	Insumo en Bodega
Microtubos 2 ml	96	si
Tiras Papel Filtro Whatman 1	48	no
Lapis para información papel	1	no
Sharpie para información tubos	1	no
Papel soporte experimento	1	no
Pipeta 10 uL	1	no
Pipeta 100o uL	1	si
Puntas 10 uL	50	si
Puntas 1000 uL	10	si
Aguja venopunción	1	si
Tubo EDTA	1	no
Tubo seco	1	si
Centrifuga tubos de sangre	1	equipo
Centrifuga microtubos	1	equipo
Descarte de puntas	1	no
alcohol para limpieza	1	no
Guantes	-	si
Cloro 1% para limpieza	1	no
caja de almacenamiento de muestras	4	si

Nota. Datos calculados previo a la realización del experimento