

# Caracterización metabólica del efecto de las variaciones preanalíticas relacionadas con la recogida y almacenamiento de muestras de biofluidos

Pérez Rambla C.<sup>1</sup>, Lluch Estellés J.<sup>2</sup>, Ahicart Momplet A.<sup>2</sup>, Abril Tormo C.<sup>2</sup>, Sifres Servà L.<sup>2</sup>, Pineda-Lucena A.<sup>1</sup>, Martínez Santamaría J.<sup>2</sup>, Puchades-Carrasco L.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratorio Bioquímica Estructural, CIPF, Valencia  
<sup>2</sup>Bio BANCO IBSP-CV / Red Valenciana de Biobancos, Valencia  
 cperez@cipf.es



## Antecedentes

En los últimos años, el desarrollo de las nuevas tecnologías "ómicas" ha supuesto un gran avance en la identificación de nuevos biomarcadores con utilidad clínica, siendo el suero y plasma sanguíneo los biofluidos utilizados mayoritariamente en este tipo de estudios. Dada la elevada sensibilidad de las tecnologías utilizadas, la existencia de variaciones preanalíticas es un punto crítico en este tipo de estudios, pudiendo influir significativamente en la calidad de los datos generados. En este contexto, los biobancos, como plataformas de apoyo a la investigación, deben poder conocer y garantizar la viabilidad de las muestras biológicas destinadas a la investigación biomédica.

## Objetivo

El objetivo principal de este proyecto, encuadrado en el área de *biospecimen research*, ha sido caracterizar a través de su estudio por <sup>1</sup>H-RMN el impacto de distintas variables de procesado y almacenamiento en los perfiles metabólicos de muestras de suero y plasma sanguíneos. Para ello se han seguido distintos protocolos de recogida y almacenamiento introduciendo variaciones en distintos puntos críticos del procesado. El análisis de los resultados obtenidos, podría conducir a la identificación de biomarcadores característicos de determinadas alteraciones metabólicas, indicativos de un inadecuado procesado y/o almacenamiento de las muestras.

## Diseño del estudio

El estudio se ha realizado con muestras de sangre periférica procedente de 40 voluntarios sanos, recogidas de manera prospectiva. Se han procesado muestras de plasma y suero para todas las condiciones incluidas en el estudio. Las variaciones estudiadas han sido:

a) Distintos aditivos en los tubos de extracción	EDTA	SST	Serum Clot activator	HEPARINA	CITRATO
b) Temperatura y tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y su procesado	30 min	1 hora	2 horas	6 horas	24 horas
	4°C y Temperatura ambiente (Ta)				
c) Grado de hemólisis	Control	Moderada	Intensa		
d) Ciclos de congelación-descongelación	1-5 ciclos				
e) Tiempo de almacenamiento a -80°C	Control	6 meses	1 año	2 años	

## Metodología

**Adquisición de experimentos de RMN:** La adquisición de los experimentos de <sup>1</sup>H-RMN para cada muestra incluida en el estudio se realizó a 310K, empleando un espectrómetro Bruker AVII 500 MHz. Los experimentos se adquirieron siguiendo los protocolos estandarizados de trabajo optimizados en el laboratorio para este tipo de muestras. Para cada muestra incluida en el estudio se obtuvo un experimento 1D-CPMG (secuencia de pulso espín-eco, Carr-Purcell-Meiboom-Gill) como el que se muestra en la figura.

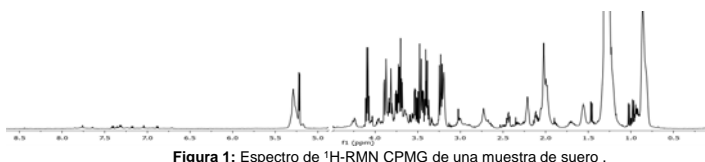


Figura 1: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN CPMG de una muestra de suero.

**Análisis estadístico de los perfiles metabólicos:** Tras el pre-procesado de los datos obtenidos mediante <sup>1</sup>H-RMN, se llevó a cabo el análisis estadístico multivariable. El análisis no supervisado (PCA) y supervisado (PLS-DA) de los perfiles metabólicos de los distintos grupos de muestras analizadas en el estudio, ha permitido analizar el impacto de las distintas variables de procesado/almacenamiento incluidas en el estudio sobre el perfil metabólico de las muestras analizadas. A partir de los modelos estadísticos generados, se han determinado las regiones de los espectros más afectadas por estos cambios, así como la evolución de estos cambios en el tiempo.

## Resultados

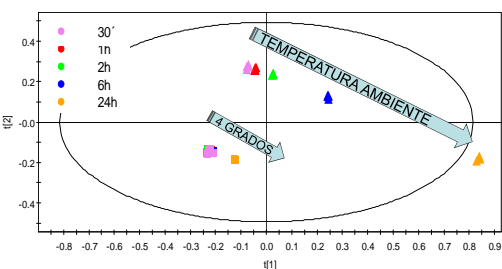


Figura 2: Análisis PCA de los perfiles metabólicos obtenidos por <sup>1</sup>H-RMN de muestras de plasma procesadas a distintas temperaturas (Ta y 4°C) y tiempos tras la extracción (30', 1h, 2h, 6h y 24h).

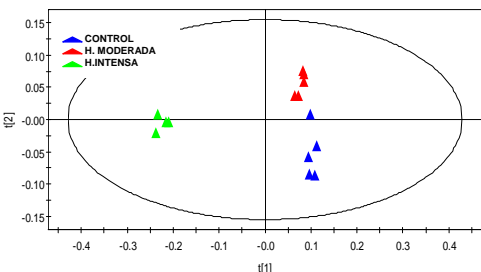


Figura 3: Análisis PCA de los espectros <sup>1</sup>H-RMN de muestras de plasma recogidas con distintos grados de hemólisis (control, moderada e intensa).

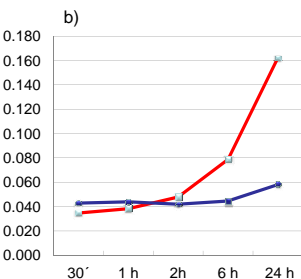
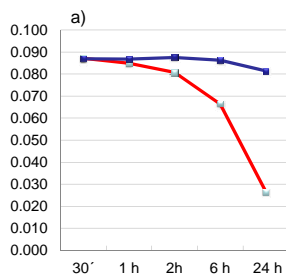


Figura 4: Gráfico de líneas correspondiente a la variación en las concentraciones medias de glucosa (a) y lactato (b) en plasma, en función de la temperatura (rojo: Ta; azul: 4°C) y el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su procesado.

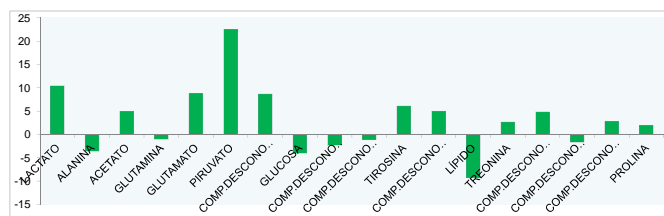


Figura 5: Gráfico de barras que representa el porcentaje de variación en las concentraciones de los metabolitos con  $p < 0.05$  entre las muestras procesadas a 4°C y Ta, en muestras procesadas a los 30 minutos tras su extracción.

Los resultados obtenidos hasta la fecha ponen de manifiesto la existencia de regiones espectrales especialmente sensibles a determinadas variaciones preanalíticas. Tanto la presencia de hemólisis, como la temperatura y el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su procesado y almacenamiento en el biobanco, alteran de manera significativa el perfil metabólico observado en las muestras analizadas, pudiendo afectar a la calidad de las mismas y por tanto, a su idoneidad para el uso en investigación.

**El efecto de la temperatura y el tiempo** desde que se recoge la muestra hasta que se procesa afecta de forma significativa a determinados metabolitos como glucosa, piruvato, lactato y algunos aminoácidos. Los cambios observados a Ta y a 4°C corresponden a los mismos metabolitos, presentando variaciones a mayor magnitud y de forma más temprana a Ta. De acuerdo con estos datos, el tiempo máximo recomendado entre la extracción de la sangre y el procesado de las muestras de suero o plasma sería inferior a 1 hora en el caso en el que se procesaran a Ta y no superior a 6 horas si se conserva la muestra a 4°C.

**El efecto de la hemólisis** también produce cambios significativos en el perfil metabólico, afectando a regiones del espectro que corresponden a aminoácidos, creatinina, piruvato y otros metabolitos. Las señales correspondientes a lípidos presentan variaciones más significativas cuanto mayor es el grado de hemólisis.

## Conclusiones

- En conjunto, los datos obtenidos hasta la fecha podrían contribuir a la optimización de los procedimientos de recogida y almacenamiento de este tipo de muestras, facilitando la identificación de biomarcadores metabólicos indicativos de la calidad de las muestras almacenadas en los biobancos.
- Los resultados obtenidos podrían permitir la evaluación de la calidad de muestras almacenadas en biobancos, mediante la comparación de sus perfiles metabólicos con muestras del mismo tipo recogidas en condiciones óptimas, determinando así su adecuación para estudios posteriores.

**Agradecimientos:** Fundación José Luis Castaño, Hospital Universitario Doctor Peset, Bio BANCO IBSP-CV de Valencia y al Centro Investigación Príncipe Felipe, Valencia.