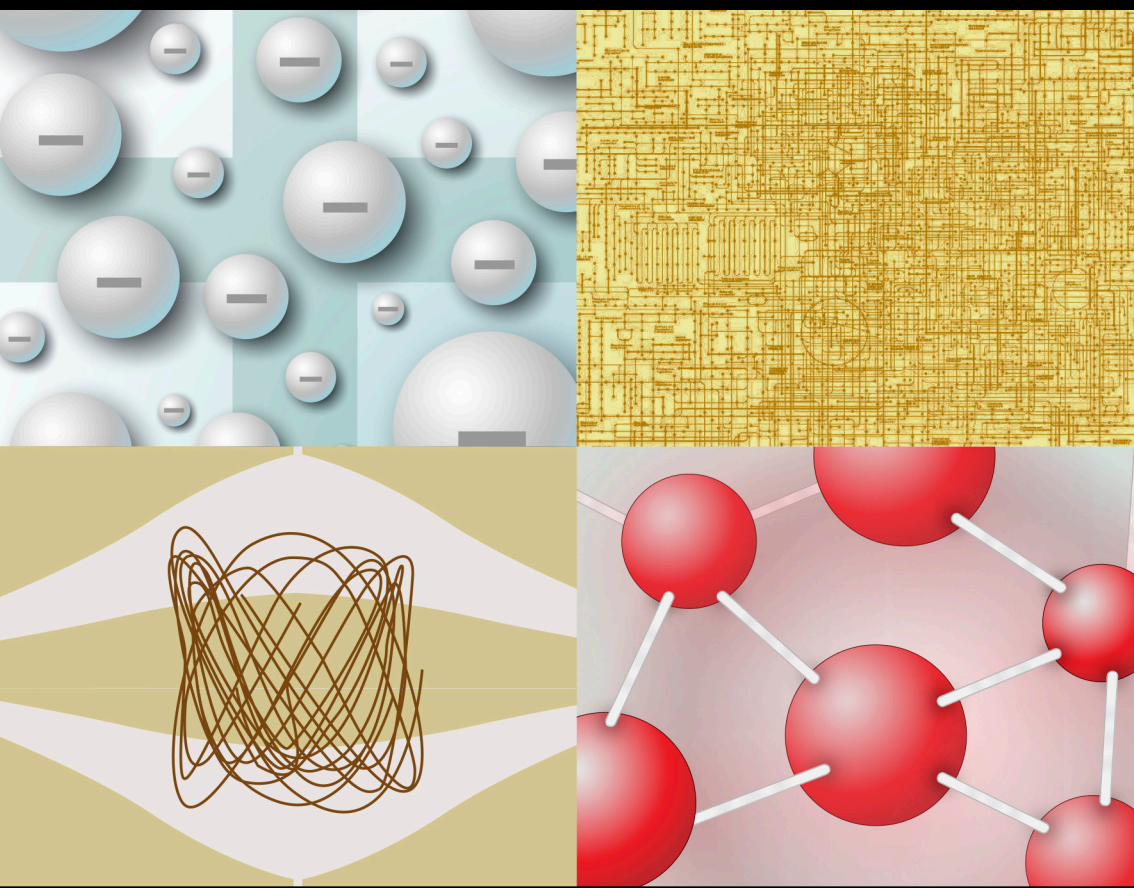


APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASA

DEL ELECTRÓN DE THOMSON A LA METABOLÓMICA

GERARDO MANUEL CABALLERO
MARIANO HERNÁN GARCÍA
Autores



Caballero, Gerardo Manuel

Aplicaciones biomédicas de la espectrometría de masa : del electrón de Thomson a la metabolómica / Gerardo Manuel Caballero ; Mariano Hernán García. - 1a ed. - Florencio Varela : Universidad Nacional Arturo Jauretche, 2020.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de Investigación)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-3679-49-0

1. Biotecnología. 2. Proyectos de Investigación. I. García, Mariano Hernán. II. Título.
CDD 660.6



Universidad Nacional Arturo Jauretche
Rector: **Lic. Ernesto Fernando Villanueva**

Directora del Centro de Política Educativa: Lic. María Gabriela Peirano
Coordinadora de la Unidad de Gestión de la Investigación: Mg. Dolores Chiappe

Coordinación editorial: Gabriela Ruiz
Diseño de tapa: Editorial UNAJ
Maquetación: Leandro Eloy Capdepón
Correctora: Victoria Piñera

© 2020, UNAJ
Av. Calchaquí 6200 (CP1888)
Florencio Varela Buenos Aires, Argentina
Tel: +54 11 4275-6100
editorial@unaj.edu.ar
www.editorial.unaj.edu.ar

Este libro fue seleccionado, con referato externo, en la Convocatoria de Publicaciones de Obras inéditas 2019, realizada por la UNAJ.

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina (CC BY-NC-ND 2.5 AR)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Universidad Nacional Arturo Jauretche

APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASA

**DEL ELECTRÓN DE THOMSON
A LA METABOLÓMICA**

**GERARDO CABALLERO
MARIANO GARCÍA**

Autores



*Gerardo Caballero dedica este libro a la ciudad de
San Salvador de Jujuy, ciudad mártir y heroica,
pero también alegre y carnavalera.*

Presentación (<i>Lic. Ernesto Fernando Villanueva</i>).....	11
Introducción	13
Capítulo 1. Conceptos básicos.....	17
1.1 Teoría atómico-molecular.....	17
1.2. Componentes de un espectrómetro de masa.....	23
Capítulo 2. Todo lo que usted quiso preguntar sobre las ómicas y nadie se atrevió a responderle.....	43
Capítulo 3. Un poco de historia de la espectrometría de masa.....	79
3.1. De los rayos catódicos a la fisión del uranio.....	79
3.2. De “ustedes no me necesitan” y polvo sobre un armatoste a los elefantes voladores.....	82
3.3. Siglo XXI. El señor de los anillos habita en el planeta Orbitrap.....	92
3.4. ¿Fin de la historia?.....	94
Capítulo 4. La espectrometría de masa en el ámbito de la biología y la salud.....	97
Capítulo 5. La espectrometría de masa como herramienta de investigación en los proyectos en desarrollo en el Instituto de Ciencias de la Salud de la UNAJ.....	107

5.1. Acidemias orgánicas	109
5.2. Lipidómica del síndrome metabólico.....	115
5.3. Ácidos grasos y sus metabolitos en circulación. Explorando potenciales biomarcadores de la hipertensión pulmonar arterial.....	120
5.4. Metabolómica del síndrome metabólico	121
Conclusión.....	125
Bibliografía.....	127
Agradecimientos	135
Sobre los autores.....	137

LIC. ERNESTO FERNANDO VILLANUEVA

Es muy grato poder presentar seis nuevos libros de la colección “Cuadernos de investigación”. La publicación de estas obras es el resultado de la maduración de las líneas de investigación y las actividades realizadas en nuestra Universidad en el marco de los proyectos UNAJ Investiga –para los que se llevan adelante convocatorias de manera ininterrumpida desde el año 2012–, así como de los primeros Proyectos de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS) financiados por el Consejo Interuniversitario Nacional. Ello ha permitido que distintos grupos de investigación hayan tomado para sí el desafío de comunicar para la comunidad en general los avances y resultados obtenidos en las investigaciones que vienen desarrollando sobre temas de salud, ingeniería, ciencias sociales y humanas de especial interés para nuestra región en particular y para el país en general. En este sentido, las nuevas obras publicadas dan cuenta también de la continuidad de la política de divulgación científica que se desarrolla en nuestra Universidad desde el año 2018.

De esta manera, con la realización de la Segunda Convocatoria para la Publicación de Obras Inéditas de Divulgación Científica, que permitió financiar los libros que compartimos, hemos dado un gran paso en el camino de fortalecimiento y profundización de las acciones de popularización de la ciencia y la tecnología. Fruto de ello, fueron aprobadas para su publicación las obras “Redes en territorio. Aportes para planificar la política de salud en nuestra región”, “Calidad de Vida en el Trabajo: Investigaciones en torno al alcance, modalidades, contextos y problemas del bienestar y padecimiento laboral”, “Pedagogía de

lo invisible: Agrotóxicos, producción, ambiente y sustentabilidad. Una experiencia de investigación-acción para construir los inéditos posibles”, “Malvinas en la Universidad: representaciones, experiencias, memorias”, “Aplicaciones biomédicas de la Espectrometría de Masa. Del electrón de Thomson a la metabolómica” y “La innovación tecnológica en las pymes industriales argentinas, características del sector eólico”.

Lograr contar la ciencia a un público amplio, a quienes no comparten nuestro campo de estudio profesional y académico, requiere despojarse de aquello que damos por sentado para poder compartir con la sociedad los conocimientos y experiencias resultantes de nuestras investigaciones mediante textos claros y accesibles, que visibilicen a la ciencia y la ponga en circulación y discusión. Es un ejercicio discursivo y reflexivo que debe apelar a la imaginación y valerse además de recursos literarios que hagan ameno y accesible un conocimiento específico a veces muy árido y despojado de encanto para quien no es especialista. Los autores y las autoras de las obras seleccionadas para su publicación han superado con creces este reto y gracias a ello sus trabajos constituyen un aporte sustantivo a la popularización de la ciencia y de la tecnología desarrollada en nuestra Universidad.

En este texto proponemos contar de qué trata la tecnología de la espectrometría de masa, cómo y por qué esta técnica analítica nacida a principios del siglo XX ha sido incorporada exitosamente a la investigación biomédica y a los laboratorios clínicos en las últimas décadas. Asimismo, explicamos el uso que le damos en los proyectos de investigación que estamos desarrollando en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Arturo Jauretche (UNAJ), en el Laboratorio N° 1 del Centro de Medicina Traslacional (CEMET) del Hospital El Cruce (HEC).

Debemos reconocer que, a la hora de escribir un texto de divulgación sobre nuestros proyectos de investigación en el área de la química analítica aplicada en salud humana, nos encontramos con una serie de dificultades. Una de ellas es el uso de las siglas: utilizaremos muchas a lo largo de este texto, las cuales serán definidas en su primera aparición: todas estas son del idioma inglés, universalmente aceptadas. Pero quizás la más significativa, es el uso apropiado del lenguaje técnico específico de la disciplina. Es inevitable en un trabajo de estas características el empleo de lenguaje técnico, pero para facilitar la lectura buscaremos definir, en las secciones siguientes y de manera simple, la mayoría de los términos técnicos que irán apareciendo a lo largo de este trabajo. Por esto, en el primer capítulo presentaremos la mayoría de los conceptos básicos necesarios para lograr comprender a grandes rasgos qué es lo que mide un espectrómetro de masa, qué información brinda esa medición, y qué conclusiones pueden derivarse de esa información. También haremos una introducción al principio de funcionamiento de los

espectrómetros de masa más empleados en la investigación biomédica y la práctica clínica.

En el segundo capítulo, describiremos algunos conceptos centrales de la bioquímica (más algunos hitos históricos de esta disciplina) esenciales para un mejor entendimiento de nuevas áreas de investigación en biomedicina: las disciplinas ómicas, en particular la metabolómica, en la que estamos involucrados. Así como la historia es muy importante para entender cómo una nación llega a ser lo que es, la historia de la ciencia (o de una rama de esta) es igualmente importante para entender que los modernos instrumentos con los que hoy trabajamos no son objetos *deus ex machina*, sino que son consecuencia de años de esforzada, y a veces inspirada, investigación de miles de personas. Por esto, un poco de historia de la espectrometría de masa en el tercer capítulo.

En el cuarto capítulo, nos introduciremos en las aplicaciones de la espectrometría de masa en la biología y la salud; para finalmente, en el quinto capítulo, contar qué es lo que hacemos nosotros con esta herramienta analítica en nuestros proyectos de investigación en el CEMET.

A lo largo de este trabajo hablaremos, de la manera más clara posible, de algunas facetas de una rama de la ciencia que es la química biológica. En estos tiempos, la ciencia (en particular la bioquímica) forma parte de la vida de cualquier persona. Solo con mirar un paquete de comida envasada, se podrán observar términos como “lípidos”, “hidratos de carbono”, “colesterol”, entre otras. Nos intentarán vender cremas con colágeno y ácido hialurónico. La gente suele decir: “debo tener las defensas bajas”; “debe ser algo psicossomático”; “me traicionó el inconsciente”; “tomate un ibuprofeno”; “me tengo que vacunar contra la gripe”, etc. Porque la ciencia forma parte de la sociedad con profundidades que a veces no se perciben claramente. La ciencia pue-

de cambiar a la sociedad (y la sociedad puede cambiar la ciencia) de maneras que a veces no son justamente valoradas. Nos acercaremos a conceptos más específicos, y no es un objetivo nuestro el hablar de epistemología ni de la relación de la ciencia con la sociedad. Ejemplo de estas relaciones y discusiones sobre el tema epistemológico en sí mismo hay muchísimas, pero nosotros recomendamos, al que le interese, la lectura de Klimovsky (2005). Como ejemplo de cuánto puede cambiar el mundo un hallazgo o postulado científico, veamos el caso de Darwin y su teoría sobre el origen de las especies. Independientemente de nuestra opinión individual al respecto, de si la teoría nos parece correcta o incorrecta o de cuan profundamente la conocemos; todos han hablado en algún momento de sus vidas de este tema, todos saben lo que es una enfermedad hereditaria, y lo que es un proceso de selección natural. El cine ha tomado esto muchas veces como tema, por ejemplo, la saga de películas *X-Men*, donde sus protagonistas son mutantes. Muchísimas personas hablan de “genes”, pero: ¿el público general no vinculado a la biología sabe realmente lo que es un “gen”? En la sección siguiente lo explicaremos, y veremos cómo este término ha dado origen a una nueva subdisciplina de la biología y la bioquímica, la *genómica*, la primera ómica. Y el surgimiento de esta nos permitirá entender las otras dos ómicas: la proteómica y la metabolómica. Todo esto a continuación.

1.1. Teoría atómico-molecular

La herramienta básica de nuestros proyectos de investigación es una herramienta analítica: la espectrometría de masa (EM, por su sigla en español, o MS, por su sigla en inglés). Así como un médico emplea tomografía de rayos X para diagnosticar posibles enfermedades, nosotros empleamos EM para estudiar la composición química de fluidos biológicos. El instrumento que hace factible estos estudios se denomina “espectrómetro de masa”. Podemos definir la EM como una técnica analítica que se usa fundamentalmente para obtener el peso molecular de una sustancia (más adelante definiremos este concepto), y para identificar compuestos desconocidos de estructura relativamente simple, ya que ella nos brinda el espectro de masa del compuesto individual, y este espectro es una especie de “huella digital”. Esta técnica también produce piezas de información muy útiles en la determinación de la estructura de moléculas complejas, y también permite cuantificar cantidades extremadamente bajas de sustancias conocidas. En estos días, existen aplicaciones de esta técnica analítica en prácticamente todas las ramas de las ciencias naturales como, por ejemplo, análisis ambientales, datación isotópica, análisis de gases, análisis de adulteración de alimentos, análisis forenses, control de sustancias prohibidas en el deporte y, más recientemente, numerosas aplicaciones en química clínica, como así también en las mencionadas “ómicas”.

Hemos introducido ya algunas palabras técnicas complejas, corresponden, pues, algunas definiciones de conceptos básicos, empezando por nociones de la teoría que explica la naturaleza de la materia: la teoría atómico-molecular. En la naturaleza y en el laboratorio, podemos encontrar sustancias simples y compuestas. Las simples están constituidas por un único tipo de elemento, como por ejemplo el hierro –elemento principal del núcleo corteza terrestre; también componente central de la hemoglobina, gracias a la cual llega oxígeno a cada una de nuestras células–, con el cual se fabrica el acero, el oro de los anillos y el gas helio, que se usa para inflar globos infantiles. En la composición de las sustancias compuestas (o “compuestos”, para mayor simplicidad), aparecen dos o más elementos diferentes, como por ejemplo el agua, que está formada por hidrógeno y oxígeno; la sal de mesa, formada por cloro y sodio; y el azúcar (sacarosa), compuesta de hidrógeno, oxígeno y carbono.

La teoría atómico-molecular explica que las sustancias elementales están formadas por átomos de un único tipo, mientras que las compuestas están constituidas por conjuntos de átomos unidos entre sí en arreglo particulares, llamados “moléculas”. Por ejemplo, la famosa y popular molécula del agua está compuesta por dos átomos de hidrógeno unidos a uno de oxígeno: H_2O . Esta teoría también enseña que en los átomos de todos los elementos se encuentran tres partículas fundamentales: protón (partícula con carga positiva), neutrón (partícula sin carga) y electrón (partícula con carga negativa). Los dos primeros se ubican en lo que se denomina el “núcleo” del átomo, y los electrones se encuentran por fuera de este. Los protones y los neutrones son partículas de aproximadamente la misma masa, mientras que los electrones son mucho más livianos y pequeños. En consecuencia, la mayor parte de la masa de un átomo se ubica en el núcleo. Por ejemplo, al núcleo del átomo de hidrógeno le corresponde un 99,95% de la masa total del átomo, y al electrón ubicado fuera del núcleo tan solo el 0,05 % restante. Obsérvese que ha aparecido otro término técnico: “masa” (en breve lo definiremos). El número de protones de cualquier átomo es

igual al número de electrones, de manera tal que los átomos son neutros, es decir, no tienen carga. Por ejemplo, el átomo más simple y liviano es el de hidrógeno, formado por un protón y un electrón. Otros elementos importantes presentes en todos los compuestos de relevancia bioquímica son el carbono, el nitrógeno y el oxígeno, cuyos átomos son más pesados que el átomo de hidrógeno, ya que poseen seis, siete y ocho protones e igual número de neutrones, respectivamente, en su núcleo. Se sigue, entonces, que cada tipo de átomo está caracterizado por el número de protones en su núcleo, que es siempre igual al número de electrones por fuera de él. En la figura 1 presentamos una visión esquemática de un átomo donde puede observarse, por un lado, el núcleo que contiene los protones y neutrones, el cual concentra la mayor parte de la masa del átomo y, por el otro, el resto del átomo, que es el espacio donde residen los electrones, partículas de menor masa, en una especie de “nube” (la unidad de distancia “Å” equivale a 0,0000000001 m -en notación científica, $1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$ -, esto permite apreciar el tamaño minúsculo de un átomo).

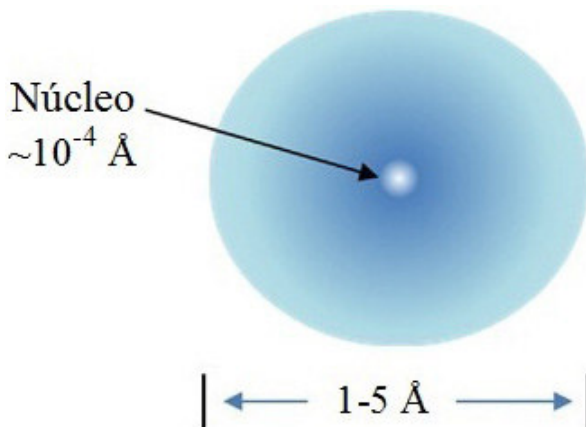


Figura N.º 1. Vista esquemática de un corte transversal por el centro de un átomo.

Fuente: elaboración propia.

Los electrones de un átomo ubicados en la “nube”, presentada esquemáticamente en la figura 1, se ordenan en distintos niveles: los que ocupan los niveles más alejados del núcleo son los que pueden formar enlaces con otros átomos, compartiendo pares de electrones y permitiendo así la formación de moléculas.

Al igual que los átomos, las moléculas tampoco tienen carga. Sin embargo, en algunas situaciones, una molécula puede perder un electrón: en este caso el número de cargas positivas en la molécula supera ahora el número de cargas negativas; la molécula se transforma así en una especie con carga neta positiva, un ion. En otras circunstancias, una molécula puede capturar un protón: en este caso la especie formada también presenta más cargas positivas que negativas, por lo tanto, también es un ion (específicamente, un ion con carga positiva se denomina “catión”, mientras que un ion con carga negativa, “anión”). Estos iones son las especies que pueden analizarse y medirse con un espectrómetro de masa.

Vayamos a la definición que habíamos dejado en suspenso, la del concepto de masa. La masa puede definirse como una medida de la cantidad de materia de un objeto, o conjunto de objetos, sea este macroscópico (un kilo de pan, por ejemplo) o microscópico (por ejemplo, una molécula de agua). Suele emplearse el término “peso” como sinónimo de “masa”, si bien esto no es estrictamente correcto desde un punto de vista físico. Así, los químicos coloquialmente hablamos del “peso de las moléculas” sabiendo que estrictamente tendríamos que referirnos a la masa. Ahora bien, el peso (o la masa) de las moléculas expresadas en kilogramos (unidad del Sistema Internacional de Unidades) (o submúltiplos, como el gramo) es un número muy pequeño y complicado para escribir y emplear en las cuentas habituales de la química y la bioquímica. Por ejemplo, la masa de una molécula de agua es aproximadamente 0,000000000000000000000003 g. Para lidiar con estas dificultades, los químicos desarrollaron un sistema de masas atómicas relativas.

Antes de explicar en qué consiste este sistema, debemos definir otro término técnico: “isótopo”. Un isótopo es un átomo de un elemento dado que difiere de otros átomos del mismo elemento en el número de neutrones presente en el núcleo. Por lo tanto, los isótopos son átomos del mismo elemento que tienen masas diferentes. Podemos usar una analogía de la vida diaria para clarificar el concepto: todas las naranjas son naranjas, pero no todas pesan lo mismo, hay naranjas grandes (isótopo pesado) y naranjas chicas (isótopo liviano). Por ejemplo, el hidrógeno tiene dos isótopos estables: el hidrógeno-1, que tiene un protón y ningún neutrón en el núcleo, y el hidrógeno-2 (también llamado “deuterio”), que tiene un protón y un neutrón en su núcleo. El deuterio forma parte de lo que se denomina “agua pesada” (o “agua deuterada”), sustancia usada en grandes cantidades como moderadora y refrigerante en centrales nucleares que utilizan uranio natural como combustible. Generalmente los isótopos más livianos de un elemento son los más abundantes. Por ejemplo, todo el elemento carbono presente en la naturaleza se presenta en forma de dos isótopos estables, carbono-12 y carbono-13, y uno inestable, carbono-14. El carbono-12, átomo que posee seis protones y seis neutrones en su núcleo, representa un 98,893% del total; el carbono-13, átomo con seis protones y siete neutrones en su núcleo, un 1,107%; y el carbono-14, átomo radiactivo con seis protones y ocho neutrones, está presente en cantidades ínfimas, por debajo de una parte en un millón. El carbono-14 es el isótopo usado en estudios de datación arqueológicos; y el carbono-13 permite, entre otras aplicaciones, verificar la autenticidad de alimentos, facilitando, por ejemplo, el reconocimiento de miel adulterada con jarabe de maíz. Así en realidad cuando nos referimos al átomo de un elemento estamos haciendo mención al isótopo más abundante de ese elemento sin tener en cuenta los restantes. Por ejemplo, un químico que menciona un átomo de carbono se está refiriendo obligadamente al carbono-12.

Volvemos ahora a la cuestión de la escala de masas atómicas relativas. Una elección lógica propuesta en el siglo XIX fue tomar la masa

del átomo de hidrógeno, el elemento más liviano de la naturaleza, como unidad de masa atómica. Sin embargo, por distintos motivos, la definición fue cambiando y, al presente, la definición de la unidad de masa atómica (u) establecida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por su sigla en inglés) está dada por la asignación de exactamente 12 u al isótopo 12 del carbono. Dicho de otra manera, una unidad de masa atómica equivale a la duodécima parte de la masa de un átomo de carbono-12.¹ Se sabe ahora que $1 \text{ u} = 1,66053873 \times 10^{-24} \text{ g}$. En esta escala de masas atómicas, el átomo de hidrógeno tiene una masa aproximada de 1 u, y el oxígeno tiene una masa de casi 16 u; por lo tanto, la molécula del agua (H_2O) tiene una masa de aproximadamente 18 u. De estos valores puede calcularse que la masa (o peso) de una molécula liviana como la del agua es de unos $0,000000000000000000000003 \text{ g}$ ($3 \times 10^{-23} \text{ g}$ en notación científica). Una molécula de azúcar común (sacarosa) no es mucho más pesada, unos $0,000000000000000000000006 \text{ g}$ ($6 \times 10^{-22} \text{ g}$), y una molécula comparativamente mucho más grande como la de hemoglobina (proteína contenida en los glóbulos rojos de la sangre de los vertebrados que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, y toma el dióxido de carbono de estos y lo transporta hasta los pulmones para su expulsión) pesa unos $0,000000000000000000000001 \text{ g}$ ($1 \times 10^{-19} \text{ g}$). Entonces ¿cómo medir la masa de algo tan liviano como una molécula? No existe ningún tipo de balanza apropiada para la tarea de “pesar” -determinar la masa de- moléculas. Las balanzas analíticas de uso corriente en los laboratorios pueden pesar hasta $0,0001 \text{ g}$, y algunas más precisas y sensibles llegan a pesar hasta $0,000005 \text{ g}$. Como se observa, unos 13 órdenes de magnitud por arriba de las moléculas más pesadas. Aquí es

1 En algunos libros de texto, en vez del propuesto por la IUPAC, todavía pueden encontrarse otros símbolos para unidad de masa atómica, tales como “uma” o “Da”; este último en homenaje al químico inglés John Dalton, el padre de la teoría atómica moderna.

donde hacen su aparición las “balanzas moleculares”: así podríamos denominar a los espectrómetros de masa, aparatos que permiten medir la masa de moléculas con carga (iones), y a partir de allí, determinar la masa de la molécula en unidades de masa atómica y, luego mediante un cálculo simple como el presentado arriba, su masa en gramos.

1.2. Componentes de un espectrómetro de masa

Fred McLafferty y František Tureček (1993) escribieron con buen humor que William Shakespeare merece ser mencionado como un visionario de la EM por sus palabras en *Hamlet*: “Contempla este ejército de tal masa y carga”. Más allá de la humorada, el comentario es pertinente, ya que la condición *sine qua non* para practicar el arte de la EM es la conversión de las moléculas neutras de un compuesto en sus correspondientes iones, es decir, las moléculas deben cargarse eléctricamente. Los instrumentos de EM (espectrómetros de masa) analizan estas moléculas con carga eléctrica (iones) en fase gaseosa mediante la determinación de su relación masa/carga (m/z). Entonces, si la molécula presenta una carga simple ($z = 1$), el cociente m/z equivale a la masa molecular (peso molecular) del compuesto estudiado, pieza de información imprescindible en el proceso de asignación de la identidad de una especie desconocida.

La EM involucra una reacción química en fase gaseosa, por esto, la muestra que se investiga no es recuperable; sin embargo, se requiere una cantidad ínfima de la muestra para el análisis. Otra faceta ventajosa de esta técnica reside en su capacidad de resolución, es decir, en la habilidad de discernir una masa molecular de otra. Cuanto mayor es la resolución del instrumento, mayor es la exactitud en la determinación de la masa y, por ende, mayor es la habilidad para evitar interferencias de compuestos con masa similar que puedan estar presentes en la muestra, y mayor es la probabilidad de encontrar la estructura correcta de un compuesto desconocido.

Existen numerosas configuraciones de espectrómetros de masa disponibles, todas ellas organizadas en tres segmentos principales:

1. Generación de iones.
2. Separación de los iones en un analizador de masas según la relación masa/carga de los iones.
3. Detección de los iones (figura 2).

Los datos registrados en el detector son procesados y presentados en forma de un gráfico -el espectro de masa- que, como puede observarse en la figura 2, muestra la abundancia de los iones (eje y) en función de sus valores de m/z (eje x). Dependiendo del modo específico de ionización, la etapa de ionización puede realizarse a presión atmosférica o a baja presión. Sin embargo, las etapas de análisis de masa y de detección de iones ocurren siempre en ambientes evacuados (presiones por debajo de las 0,00000001 atmósferas) para permitir que los iones generados en la fuente alcancen inalterados el detector. Para esto, el número de moléculas de nitrógeno y de oxígeno del aire debe ser muy baja dentro del analizador, lo que implica retirar todo el aire posible de su interior. Estas presiones muy bajas (o “alto vacío,” como se denominan en la jerga de la EM) se consiguen con el uso combinado de dos bombas: una bomba mecánica, que brinda presiones del orden de 0,0001 atmósferas, situación a partir de la cual arranca la bomba de “alto vacío” conectada a la mecánica. Este segundo tipo de bombas, difusoras o turbomoleculares, cuando alcanza su régimen operativo óptimo consigue las presiones adecuadas para el funcionamiento normal del espectrómetro de masa.

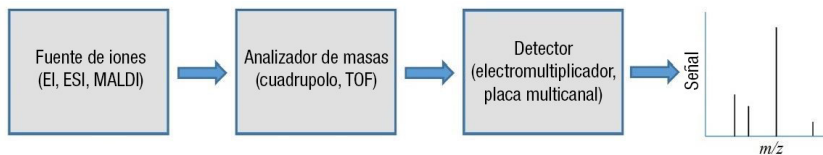


Figura N.º 2. Diagrama esquemático de un espectrómetro de masa.

Fuente: elaboración propia.

A las etapas indicadas en la figura 2 debe agregarse una etapa de introducción de la muestra en la fuente de iones. En instrumentos especiales, y en muy pocos casos, la muestra a analizar se introduce en la fuente de iones como un compuesto puro. Es mucho más frecuente el análisis de mezclas de complejidad variable que se introducen en línea, inyectándolas en un sistema de separación cromatográfica –con un cromatógrafo de gases (CG) o de líquidos (CL), dependiendo del tipo de fuente de ionización– que separa en el tiempo los componentes de la mezcla, lo que permite así su ingreso al espectrómetro de masa de manera secuencial.

Unas palabras acerca de los métodos cromatográficos. Podemos definir la “cromatografía” como una técnica de separación de componentes de una mezcla basada en la distribución de estos entre una fase estacionaria, la cual se encuentra contenida en una columna, y una fase móvil; esta última fluye a través de la fase estacionaria. El nombre de la técnica (del griego *chroma*, “color” y *graphos*, “escribir”) nos hace pensar en colores. Entonces ¿sirve esta técnica para separar compuestos coloreados solamente? No, la cromatografía es apropiada para separar todo tipo de compuestos, coloreados e incoloros. El nombre “cromatografía” fue acuñado por el botánico ruso Mikhail Tsweet, quien, en 1906, colocó un extracto de pigmentos vegetales en una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio (un material muy parecido a la tiza),

posicionada verticalmente, por la que hizo pasar el líquido éter etílico (un solvente muy común en los laboratorios de química orgánica). A medida que el líquido bajaba por la columna, Tsweet observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas, que él asignó a ciertos compuestos presentes en el extracto vegetal, por ejemplo: anaranjada, para los carotenos; distintos tonos de verde, para las clorofilas A y B; y amarillo, para la luteína. La columna cromatográfica esquemática mostrada en la Figura 3 es una representación certera de los primeros experimentos de Tsweet. Podemos ver en la misma figura que el flujo de fase móvil transporta los componentes de la mezcla, inyectada al inicio de la columna, hacia la salida de la columna. En el trayecto a través de la columna, los componentes de la mezcla, arrastrados por la fase móvil, que es un líquido o un gas según la técnica, son retenidos por la fase estacionaria; es decir la fase que permanece fija en el interior de la columna. Los tiempos de retención de cada compuesto particular son diversos, dependen de su naturaleza química y de la composición química de la fase estacionaria. De acá se sigue que la separación de los componentes de la mezcla es una consecuencia de esta retención diferencial por parte de la fase estacionaria, lo cual se traduce en distintos tiempos de viaje de los diversos compuestos a lo largo de la columna cromatográfica (si un compuesto es muy retenido por la fase estacionaria, llevará más tiempo en recorrerla y salir por el otro extremo). Por esto, cada compuesto de la mezcla tendrá, en una determinada fase estacionaria y con una cierta fase móvil, su propio tiempo de retención; parámetro que se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el registro del compuesto en el detector ubicado a la salida de la columna.



Figura N.º 3. Columnas de cromatografía.

Fuente: a) Wikimedia Commons b) y c) Agilent (con permiso).

Existen dos tipos principales de técnicas cromatográficas analíticas: la cromatografía de gases (CG, conocida en inglés como *Gas Chromatography* –GC–) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, conocida en inglés como *High Performance Liquid Chromatography* –HPLC–). En la figura 3 presentamos imágenes de columnas cromatográficas de ambos tipos. Las columnas de GC son columnas llamadas “capilares” (por su muy pequeño diámetro de apertura, del orden de un cuarto de milímetro) de unos 25 o 50 m de largo. Podemos ver, en la figura 3, que esos 25 m de la columna capilar están enrollados en un soporte metálico. Esto es posible porque el material constitutivo de los capilares, de naturaleza vítrea quebradiza, está recubierto de un plástico flexible. Estas columnas capilares contienen en su interior una muy fina capa (décimas de micrómetros) de una sustancia polimérica, ligada químicamente al interior del capilar, que interactúa selectivamente con los componentes de la mezcla al permitir la separación progresiva de estos a medida que el gas de transporte (nitrógeno, hidrógeno o helio) fluye por la columna.

Por otro lado, las columnas de HPLC contienen un cartucho plástico relleno de partículas de unos 5 micrones (μm) de diámetro de la fase estacionaria (usualmente la sílica² o sílica modificada químicamente). Este cartucho está contenido en un cilindro de acero inoxidable o aluminio, usualmente de 25, 15 o 10 cm de largo, como puede verse en la figura 3b. Por estas columnas fluye la fase móvil líquida, que, en las aplicaciones más comunes, es una mezcla de agua y metanol, mezcla completamente homogénea (el metanol es un alcohol sencillo y barato, muy común en los laboratorios, pero también es un compuesto tóxico que puede provocar ceguera y muerte si es ingerido).

El material de relleno contenido en una columna de HPLC está muy comprimido, ya que las partículas constitutivas son muy pequeñas. Por esta razón, los instrumentos de HPLC están provistos de bombas de pistón que succionan la fase móvil de un recipiente y la empujan a través de la columna; de otra manera no habría flujo posible. En 2004 apareció una variante de la HPLC llamada *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC), en nuestro idioma sería cromatografía líquida de ultrarresolución (CLUR), que emplea columnas donde el material de relleno son partículas de diámetro inferior a los 2 μm . Estas columnas solamente pueden usarse con los equipos de UHPLC porque solo estos pueden llegar a las muy altas presiones necesarias para hacer fluir la fase móvil, valores de presión que un equipo convencional de HPLC no alcanza .

Hablamos de cromatografía analítica para diferenciarla de las técnicas cromatográficas preparativas, comunes en cromatografía de líquidos. En estas el objetivo es la purificación de una cierta masa de

2 La sílica es un material compuesto de los elementos silicio y oxígeno, y es el componente principal de los granos de arena.

un compuesto (miligramos o gramos, de acuerdo a la escala) y su recuperación para trabajos ulteriores. Cuando decimos “cromatografía analítica”, nos estamos refiriendo a las técnicas cuyo objetivo es la determinación del número de compuestos presentes en una mezcla, y la cuantificación de cada uno de ellos. En estos casos no nos interesa recuperar los componentes de la mezcla, tan solo su detección. Para esto se utilizan diversos detectores que responden a alguna propiedad de los compuestos separados, y de esta manera generan una señal que es proporcional a la cantidad del compuesto. En GC, el detector más común es el de ionización de llama (en inglés, *Flame Ionization Detector* –FID–), donde los compuestos se queman y generan una corriente eléctrica medible. Por su parte, en HPLC, el detector más popular es un equipo que mide la radiación en la porción ultravioleta y visible del espectro electromagnético (UV/Vis) emitida por una lámpara. Esta radiación puede ser absorbida por los compuestos, absorción que depende de su estructura química, y que, a la vez, es proporcional a la masa de cada uno de ellos.³

Ahora bien, en lugar de un equipo de UV/Vis, cuando a la salida del sistema de cromatografía se adosa un espectrómetro de masa como detector, tenemos instrumentos mucho más potentes, ya que estos detectores nos posibilitan cuantificar las componentes de las muestras con mucha mayor sensibilidad, y adicionalmente nos brindan el espectro de masa de cada uno de ellos. Por ende, podemos también identificar las correspondientes estructuras químicas o, al menos, aproximarnos a esa identificación. Entonces, cuando el detector del sistema de cromatografía analítica es algún tipo de espectrómetro de masa, hablamos de

3 Una acotación al margen: el espectro electromagnético es muy amplio; no solo incluye la radiación ultravioleta y visible, sino muchos otros tipos de radiación como por ejemplo los rayos X, la radiación de microondas, y las ondas de radio y televisión.

“métodos acoplados cromatografía-espectrometría de masa”. Se tienen así instrumentos de cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-EM, o GC-MS por su sigla en inglés) y de cromatografía de líquidos-espectrometría de masa (CL-EM, o HPLC-MS por su sigla en inglés y, más recientemente, CLUR-EM, o UHPLC-MS por su sigla en inglés). La mayor complejidad de estos instrumentos reside en el espectrómetro de masa, de hecho, es usual que en este tipo de equipos el costo del cromatógrafo sea solo un 15% del costo total.

Para responder las tres preguntas fundamentales: ¿cómo se generan los iones?, ¿cómo se analizan?, ¿cómo se detectan?, volvamos ahora a los componentes de un espectrómetro de masa. Las fuentes de iones más empleadas en aplicaciones clínicas de la EM son las indicadas en la figura 2:

- la ionización (o el impacto) electrónico (en inglés, *Electron Ionization* –EI–),
- la ionización por electroespray (en inglés, *Electrospray Ionization* –ESI–)
- la ionización por desorción láser asistida por la matriz (en inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* –MALDI–).

Por su parte, los analizadores más frecuentemente encontrados en los espectrómetros de masa usados en los laboratorios clínicos son los cuadrupolos, los triple cuadrupolos, los sectores magnéticos, las trampas de iones de diversa índole y los analizadores de tiempo de vuelo (en inglés, *Time of Flight* –TOF–) . Los detectores comúnmente usados son las copas de Faraday, los electromultiplicadores de dinodos discretos o continuos, y las placas multicanal (en inglés, *Multiple Channel Plate* –MCP–). Una descripción detallada del principio de funcionamiento

de fuentes, analizadores, detectores y bombas de vacío corresponde a un curso de química analítica instrumental de cuarto año de una carrera de Química o Bioquímica, por lo cual está más allá de los alcances de esta reseña. Sin embargo, desarrollaremos a continuación una breve descripción del funcionamiento de alguno de estos componentes para una mejor comprensión de las aplicaciones clínicas generales y de las aplicaciones usadas por este equipo de investigación.

Fuentes de iones

Presentamos en la figura 4 una representación esquemática de una fuente de ionización electrónica (EI). Estas fuentes son cubos o cilindros, de unos 50 cm³ de volumen, mantenidos a muy baja presión y a temperaturas superiores a 150 °C, donde se introduce el compuesto a analizar en estado gaseoso. Las moléculas del compuesto son “impactadas” por un haz de electrones emitidos por el filamento, y en ese proceso se desprenden electrones de las moléculas, lo cual genera los iones con cargas positivas del compuesto. Estos iones son luego expulsados de la fuente mediante la aplicación de un voltaje positivo del orden de los 5 voltios (V) en el repulsor de iones y, de esta manera, los iones llegan a la rendija de salida de la fuente y de allí siguen viaje hacia el analizador del espectrómetro. Este tipo de fuente es la óptima para compuestos volátiles, de peso molecular inferior a 600 u, y, por lo tanto, puede acoplarse con mucha facilidad a un equipo de cromatografía de gases, que es el que permite el ingreso de la muestra a la fuente.

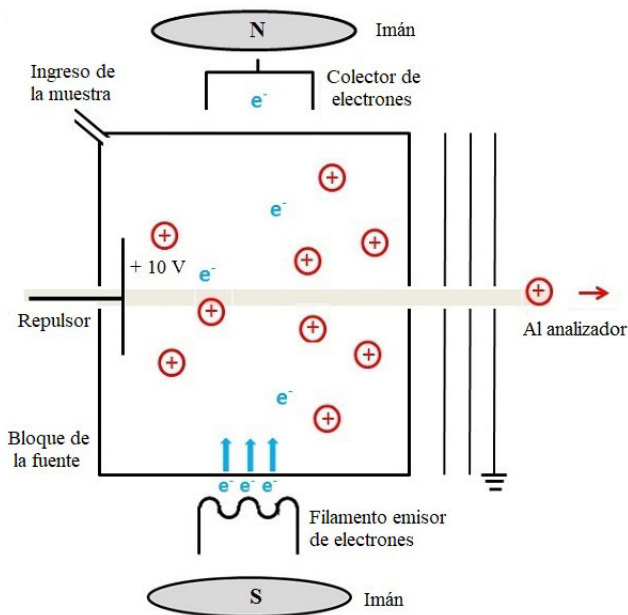


Figura N.º 4. Fuente de ionización electrónica (EI).

Fuente: Thilini Ukwaththage (adaptada con permiso), CC BY-SA 4.0
 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons.

En la figura 5 mostramos un esquema de una fuente de ionización MALDI y una fotografía de una placa soporte para la ubicación de las muestras a analizar. Para este tipo de análisis, el analito (por definición, el compuesto que se desea estudiar) se mezcla con una sustancia líquida (la matriz) capaz de absorber la energía del láser. La mezcla colocada en los pocillos de la placa soporte es luego irradiada por un pulso láser cuya duración es del orden de los nanosegundos (0,000000001 s). Esa irradiación provoca una serie compleja de fenómenos que termina con la expulsión de moléculas cargadas del analito y de la matriz hacia la fase gaseosa. Como la placa soporte está conectada a un voltaje positivo del orden de los 20.000 V, los iones positivos son expulsados hacia la grilla de extracción conectada a tierra (0 V) y de allí hacia el TOF. Todo

este proceso se realiza en un ambiente evacuado, pero a temperatura ambiente -diferencia significativa con el método de EI-, esta es una de las razones por las que las moléculas grandes y termolábiles (como las proteínas, entre otras) pueden ser ionizadas por MALDI.

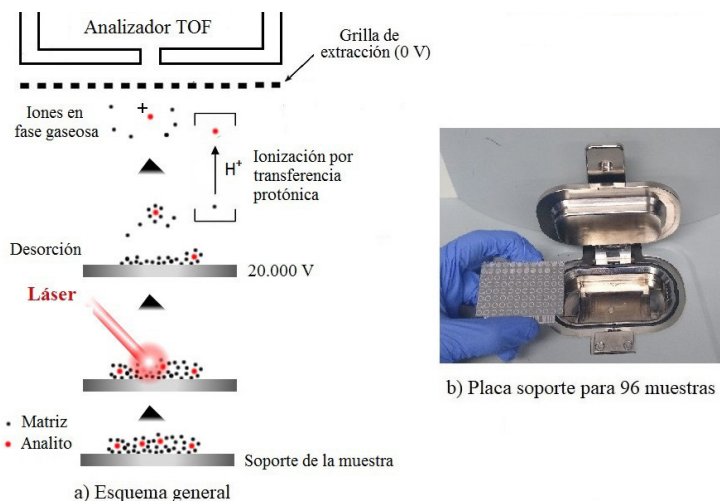


Figura N.º 5. Fuente de ionización MALDI.

Fuente: a) Adaptado de Keministi, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons. b) Spicy, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons.

En la figura 6 presentamos esquemáticamente una fuente de ionización ESI, junto a una fotografía de este tipo de fuente. Esta fuente consiste en un electrodo metálico, por donde fluye la solución proveniente de un sistema de cromatografía de líquidos impulsada adicionalmente por una corriente de gas nitrógeno, enfrentado a un contraelectrodo (que puede estar a 90° como se muestra en la figura 6b). Entre ambos, electrodo y contraelectrodo, se establece una diferencia de potencial del orden de los 4.000 V, generándose, de esta manera, un spray cargado eléctricamente. Una corriente transversal adicional de nitrógeno y una temperatura superior a 200°C ayudan a reducir el tamaño de las gotas de ese spray al

punto de que, llegado a un cierto tamaño de la gota, las cargas positivas en su superficie repelen al analito desde el líquido hacia la fase gaseosa (como se describe en el círculo de la figura 6), proceso conocido como “evaporación iónica”. Los iones así generados son impulsados a continuación por la diferencia de voltaje hacia el interior del analizador. Como puede observarse, en este caso, a diferencia de las dos fuentes anteriores, el proceso de ionización ocurre a presión atmosférica.

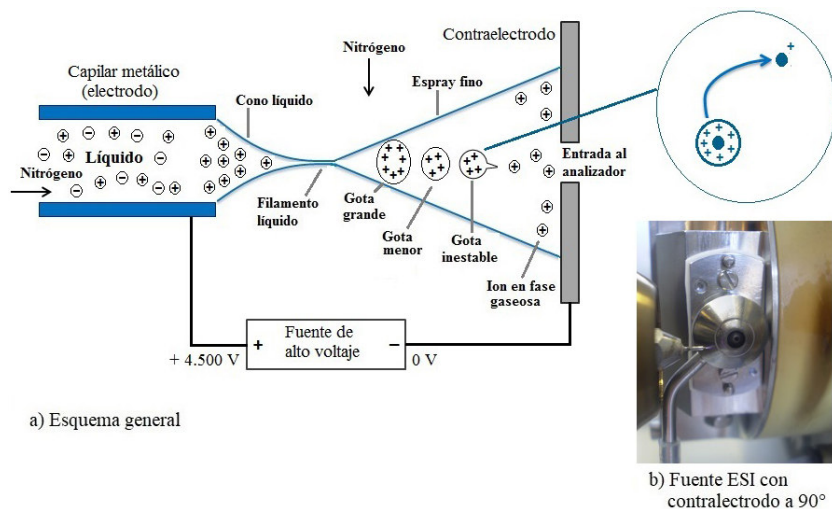


Figura N.º 6. Fuente de ionización por electrospray (ESI).

Fuente: a) elaboración propia. b) Robert White, CC BY-SA 3.0
 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons.

Analizadores

Uno de los analizadores más frecuentemente encontrados en los espectrómetros de masa modernos es el cuadrupolo. Físicamente un cuadrupolo consiste en un conjunto de cuatro electrodos, varillas metálicas de unos 15 cm de largo, idealmente de sección cruzada hiperbólica, que están exactamente posicionados en un arreglo radial (la forma hiper-

bólica de estos electrodos semeja un círculo perfecto que hubiera sido “aplastado” un poco). Por razones prácticas y económicas, la mayoría de los cuadrupolos están armados con electrodos de sección cruzada circular (figura 7). El funcionamiento de un cuadrupolo se muestra esquemáticamente en la figura 8. Las varillas cilíndricas están conectadas a una combinación de voltajes de corriente continua (U) y corriente alterna ($V \cos \omega t$); dos, a positivo y dos, a negativo.⁴ Esta combinación de voltajes genera un campo eléctrico oscilante en el interior del cuadrupolo que afecta el movimiento de los iones en su interior. Para una dada relación de los voltajes U y V solo los iones de un rango estrecho de valores de m/z tendrán una trayectoria estable, con oscilaciones tan pequeñas que no llegarán a golpear las paredes del cuadrupolo, y podrán salir y llegar al detector. Los demás iones presentan una trayectoria inestable y terminan chocando con las paredes de las varillas, por lo tanto, no llegan al detector. Para poder hacer un barrido de todo un rango de valores de m/z , y de esta manera poder registrar un espectro de masa completo, se van subiendo los voltajes manteniendo constante la relación entre ellos. De esta manera, los valores de m/z de cada ion se calculan conociendo los valores de U y V que permiten que el ion alcance el detector. Estos barridos de voltaje se pueden hacer de manera muy rápida, de manera tal que los modernos cuadrupolos realizan ciclos de barrido, es decir, registros de un espectro de masa completo en el orden de 1 a 500 m/z , por ejemplo, de unos 50 espectros por segundo. Una limitación de los cuadrupolos es la baja resolución. Hablamos de “resolución unitaria” en el caso de los cuadrupolos, es decir que estos tienen la capacidad de resolver valores de m/z contiguos, por ejemplo, pueden discernir un ion de m/z 200 de otro de m/z 201. Pero no más allá, es decir, no permiten la determinación de masas exactas, masas hasta el cuarto decimal.

4 La corriente continua es el tipo de corriente eléctrica generado por una pila, mientras que la corriente alterna es el tipo de corriente existente en las instalaciones domiciliarias.



Figura N.º 7. Cuadrupolo de sección cilíndrica.

*Fuente: "The Mass Spectrometry Museum"
(<https://www.ms-museum.org>). Cortesía del Dr. Josef Cavčka.*

Como un ejemplo más de cómo la ciencia básica es el soporte imprescindible de toda innovación tecnológica, es interesante que mencionemos que la descripción rigurosa del movimiento de los iones dentro de un cuadrupolo y, por lo tanto, la optimización de todos sus parámetros operativos, se consigue resolviendo la ecuación diferencial de Mathieu, ecuación introducida en la segunda mitad del siglo XIX por el matemático francés Émile Mathieu en su trabajo sobre los modos vibracionales de una membrana estirada que presenta un contorno elíptico (Miller y Bonner Denton, 1986). Es decir, Mathieu describió matemáticamente cómo vibra la membrana de un tambor, por ejemplo, cuando es golpeado con un palo o una mano en la ejecución de una pieza musical. Un siglo después apareció una aplicación práctica para aquella curiosidad teórica.

Otros analizadores que guardan relación con los cuadrupolos son las trampas de iones. Existen diversas variantes de estas, tales como

la trampa cúbica, la trampa lineal y la trampa-C. No explicaremos el funcionamiento de cada una, nos basta con mencionar que la trampa-C está íntimamente ligada al funcionamiento del Orbitrap, analizador que sí describiremos más adelante.

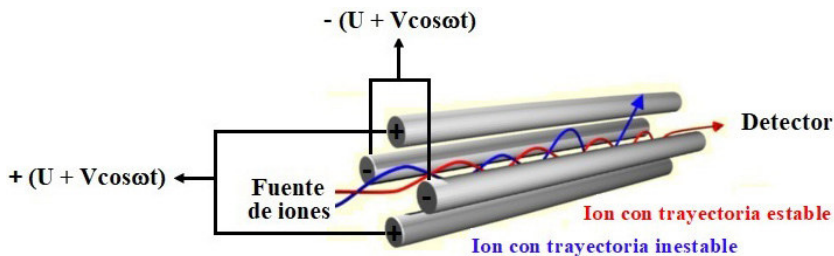


Figura N.º 8. Funcionamiento de un cuadrupolo.

Fuente: adaptado de Elisemarión 15:57, June 2007 (UTC), CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons.

El analizador de TOF es otro analizador significativo encontrado en instrumentos dedicados a aplicaciones clínicas y biomédicas. Un esquema de un TOF se describe en la figura 9, junto con una fuente de ionización MALDI asociada al TOF. Esta es la configuración más común para un analizador de estas características, es decir, una configuración que se denomina “MALDI-TOF”; aunque también suele encontrarse un analizador TOF en equipos con fuentes de ionización electrónica. El principio de funcionamiento de este analizador es muy simple, ya que en el interior del tubo de vuelo no se aplica ningún campo eléctrico ni magnético; los iones que ingresan al tubo vuelan hacia el detector empujados por un voltaje de aceleración aplicado en la fuente. Entonces, como todos los iones reciben el mismo empuje, los iones van llegando al detector en orden creciente de masa, es decir, los iones más livianos llegan primero, los más pesados, más tarde; una

verdadera carrera de iones donde siempre gana el más liviano. Entonces, registrando el tiempo de llegada al detector de los distintos iones, se tiene la información de sus masas (los tiempos de vuelos están en el orden de los microsegundos: 0,000001 s). Existen versiones más complejas de este analizador que incorporan un reflector de iones, o espejo iónico, que tiene la función de aumentar el recorrido de los iones en su camino al detector y, por lo tanto, de mejorar la resolución provista por un TOF.

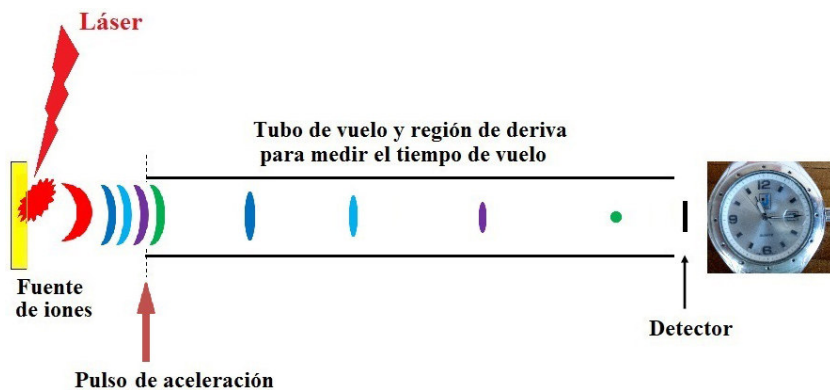


Figura N.º 9. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).

Fuente: elaboración propia.

Por su parte, el único analizador inventado en este siglo es el Orbitrap. Este es un pequeño dispositivo compuesto por un electrodo central en forma de huso de unos 4 cm de largo, rodeado por el electrodo externo dividido en dos, cuya forma semeja a un barril de 3 cm de diámetro interno máximo. En la figura 10 puede observarse una fotografía de un analizador de este tipo, del cual se removió una mitad del electrodo externo, colocado al lado de una moneda de 1 euro para una mejor percepción de las dimensiones del dispositivo. Los iones

ingresan al Orbitrap inyectados desde un dispositivo conocido como trampa-C en pulsos del orden de los microsegundos. Al momento de la inyección se establece, entre el electrodo externo y el central, una rampa de voltaje entre 0 y -5.000 V de unos 100 milisegundos (ms) de duración (el lector debe tener en cuenta que todo lo que ocurre dentro de un espectrómetro de masa sucede muy, muy rápido). En ese lapso tan breve los iones quedan atrapados en forma de anillos que oscilan a lo largo del electrodo central con una frecuencia de oscilación característica de cada valor de m/z . Esta oscilación genera en el electrodo externo una corriente imagen que decae con el tiempo. Esta corriente es la señal cruda inicial que es luego tratada matemáticamente mediante una operación denominada “transformación de Fourier”. Esta operación matemática, incorporada al sistema de datos del instrumento, permite establecer la frecuencia de oscilación de los iones y con este valor se calcula luego la relación m/z . Complicado, ¿no? Sí; quizás el Orbitrap sea uno de los analizadores más difíciles de entender. Resulta interesante mencionar que la transformación de Fourier es una operación matemática muy utilizada en otras ramas de los análisis instrumentales tales como la resonancia magnética nuclear aplicada a la resolución de problemas estructurales propios de la química orgánica, como así también en la obtención de imágenes de tejidos por resonancia magnética, las que actualmente son una pieza esencial del diagnóstico médico.

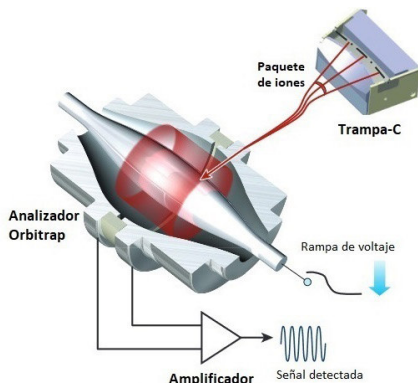
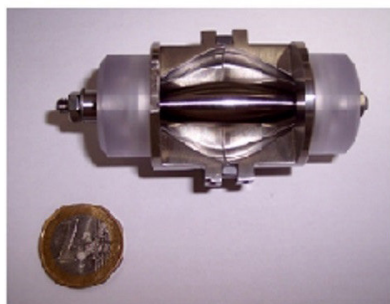


Figura N.º 10a. Fotografía de un Orbitrap. **Figura N.º 10b.** Principio de funcionamiento.

Fuente: a) y b) ©Thermo Fisher (con permiso).

El Orbitrap es el ejemplo más reciente de un analizador que funciona en tándem, es decir, asociado a otros analizadores. Los primeros analizadores en tándem que aparecieron en el mercado fueron los comúnmente denominados “triple cuadrupolos”, sistemas que consisten en un primer cuadrupolo analizador seguido de una cámara de colisión (la cual suele ser una hexapolo) y luego un segundo cuadrupolo analizador. Estos triple cuadrupolos (denominados QqQ, donde “Q” designa los cuadrupolos analizadores y “q”, la cámara de colisión) permiten realizar diversos experimentos de EM en tándem,⁵ tales como el monitoreo de reacciones múltiples (MRM), el tipo de experimento mandatorio para los análisis de trazas, es decir, análisis de compuestos que se encuentran en muy baja concentración en una matriz determinada, concentración del orden de los microgramos por litro o menores.

5 También llamados “experimentos de masa/masa” -EM/EM, o MS/MS por su sigla en inglés-.

De hecho, los triple cuadrupolos son los instrumentos de elección para detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de compuestos. Otros equipos que funcionan en tándem son los híbridos Q-TOF, donde el cuadrupolo analizador Q es seguido de una cámara de colisión, y esta, a su vez, de un analizador de TOF. Debido a la elevada resolución de los analizadores TOF, estos instrumentos permiten la determinación de las masas exactas de los iones, productos generados en la cámara de colisión intermedia, que facilitan de esta manera la elucidación estructural de estos iones y, en última instancia, la elucidación de la estructura de la molécula de la cual provienen.

Detectores

Los detectores comúnmente usados en los espectrómetros de masa son multiplicadores de electrones, sistemas que transforman la carga eléctrica portada por los iones, previamente separados por el analizador, en electrones. Estos multiplicadores de electrones pueden ser de dínodos⁶ discretos o continuos en los instrumentos que tienen un cuadrupolo, triple cuadrupolo o trampa de iones como analizador. Cada dínodo se mantiene a un potencial mayor al anterior, de manera tal que, los electrones generados en el primer dínodo son dirigidos hacia el segundo, luego al tercero, y así siguiendo hasta la salida donde se encuentra el sistema de registro electrónico de la señal amplificada. Los electrones en el interior del detector son multiplicados geoméricamente, es decir, por cada electrón que impacta la superficie de un dínodo se generan dos electrones. Estos dos impactan sobre un segundo dínodo generando cuatro, cuatro generan ocho, ocho dieciséis, dieciséis treinta y dos, y así siguiendo. Por esto, estos dispositivos son muy eficientes, las señales registradas están amplificadas en el orden de 10^5 . Cuando

6 Se entiende por dínodo a los elementos constituidos por vidrio dopado con plomo.

el analizador del espectrómetro es un TOF, el detector usual es una placa multicanal. Esta placa, generalmente de níquel-cromo, de 2 mm de espesor, presenta un arreglo regular de tubos diminutos (los microcanales, de unos 10 μm de diámetro) que atraviesan la placa de lado a lado, paralelos entre sí. Por aplicación de un campo eléctrico intenso a través de la placa, cada microcanal individual se convierte en un multiplicador de electrones de dínodos continuos. Para mayor información, en la figura 10 presentamos esquemas y fotos de detectores de dínodos continuos y de placa multicanal.

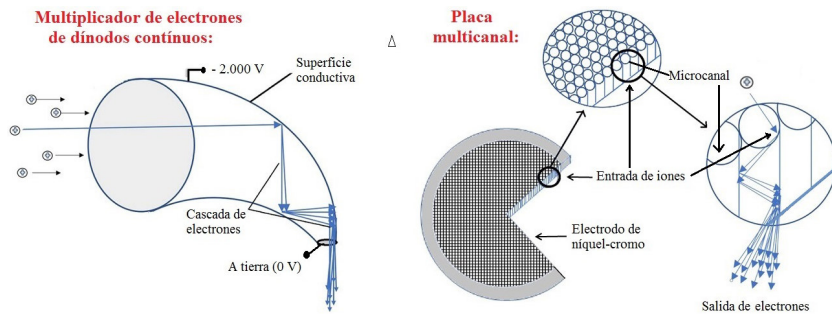


Figura N.º 11. Multiplicadores de electrones.

Fuente: elaboración propia.

Todo lo que usted quiso preguntar sobre las ómicas y nadie se atrevió a responderle

Hemos explicado en el capítulo 1 lo que es un átomo y lo que es una molécula; ahora estamos en condiciones de explicar algo mucho más complejo: qué es un gen. Hasta cierto punto, se puede tener una idea de un gen partiendo solamente del conocimiento de que nuestro cuerpo está formado por células, y que cada una de casi todas esas células posee un núcleo en su interior, perfectamente delimitado y posible de ser visto con la ayuda de un simple microscopio. Dentro de ese núcleo se encuentra el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN es un compuesto cuya descripción molecular corresponde a una molécula extremadamente larga (hablamos de cerca de 1 m, para un compuesto químico esto es una longitud verdaderamente enorme). Dentro del núcleo celular, el ADN no es una única molécula con cualquier disposición espacial, sino que se halla dividida en veintitrés cromosomas complejamente organizados. Además, todos los cromosomas se encuentran duplicados, lo que hace un total de 46 cromosomas presentes en el núcleo. Resulta fascinante lo que esta molécula contiene: nada más ni nada menos que información. En cada núcleo está la información completa para eventualmente generar otro individuo físicamente idéntico, un proceso llamado “clonación”. Químicamente, el ADN es un polímero, es decir, una larga molécula formada por las mismas cuatro estructuras químicas, conocidas como “nucleótidos”. Esta se puede comparar con

una cadena, cuyos eslabones son las bases nucleotídicas, que se llaman “adenina” (A), “timina” (T), “citosina” (C) y “guanina” (G). Así como el español escrito presenta una sucesión de veintisiete letras, en el ADN, el lenguaje que contiene información está constituido por la sucesión de estas cuatro bases. Sí, la diferencia entre dos personas, desde el punto de vista genético, será, específicamente, cómo está ordenado en cada caso el ADN, esta larga cadena de bases nucleotídicas. Pareciera no haber nada de misterioso: un libro trata sobre historia argentina y el otro es una novela policial, pero los dos están formados por las mismas veintisiete letras separadas por espacios. Pero para darnos cuenta un poco de las dimensiones de este lenguaje contenido en el ADN, baste el siguiente ejemplo: en este momento, usted ha leído cerca de 2.600 palabras, mientras que la información contenida en el ADN correspondería a un total de 23.000 libros (Sagan, 1977), algo que la vida no nos permite leer por ser muy breve.

Ahora bien; la pregunta había sido ¿qué es un gen? Y hasta ahora no hemos hablado de ellos. Así como el lenguaje puede ser leído y cada palabra tiene un significado, el ADN también es leído. Partiendo de esa lectura, se genera un ácido emparentado, el ácido ribonucleico (ARN) y, a partir de este, compuestos de importancia crucial para la vida, conocidos como “proteínas” (las cuales son también sustancias poliméricas, en este caso, los eslabones de sus cadenas se denominan “aminoácidos”). Es decir que el ADN no es otra cosa que el lenguaje que dicta las instrucciones para que, en última instancia, las proteínas sean sintetizadas. La reducción que estamos haciendo del tema es enorme; detrás de cada concepto hay mucho para profundizar, pero que escapa por completo a los alcances de este texto de divulgación. Sin embargo, podemos continuar con la analogía del lenguaje un poco más, ya que el lenguaje escrito no es solamente una secuencia de letras, sino que está estructurado en palabras; para ello utilizamos espacios: para diferenciar una palabra de otra. En el ADN está la información para sin-

tetizar miles de proteínas, y a cada porción que sintetiza una proteína se la conoce como “gen”. Entonces, cada gen es una palabra (secuencia de nucleótidos), que tiene un significado particular (la estructura de una proteína). Esta idea un gen implica una proteína no es exactamente cierta, pero basta para los objetivos de este texto. El término “gen” fue acuñado por primera vez por el botánico Wilhelm Johannsen en 1909 (Anker, 1932), a partir de lo que Mendel había llamado “factor”. Este último lo llamó “factor genético” por el griego “generar”. En el momento en que Johannsen comienza a hablar de genes, se tenía mucho menos idea de lo que podía significar de lo que cualquier persona de hoy en día puede tener. Es recién a mediados del siglo XX cuando se establecen la estructura y el funcionamiento del ADN (Watson y Crick, 1953).

Ahora que tenemos cierta idea de lo que es un gen, podríamos hacernos otra pregunta ¿se puede conocer la secuencia de un gen? La respuesta es sí: la primera vez que se logró fue en 1973; y en 1975, fueron Sanger y Coulson quienes desarrollaron un método, que continúa utilizándose hasta la actualidad, para secuenciar cualquier parte del ADN (Sanger y Coulson, 1975). Esto lo hizo acreedor de su segundo Premio Nobel de Química en 1980, en conjunto con Paul Berg y Walter Gilbert. Muy merecido este Premio Nobel compartido a Frederick Sanger, ya que su método permitió encontrar la secuencia, los eslabones de la cadena que forma el ADN, es decir, se pudo comenzar a “leer” el ADN.

Al total de información del ADN, que contiene todo el material genético, toda la información necesaria para crear y mantener con vida un organismo, se lo conoce como “genoma” (Van Heyningen, 2019).

A simple vista parece sencillo: un gen es una parte del ADN que posee la información para sintetizar una proteína; y al conjunto total de información genética, con todos sus genes incluidos, se lo denomina “genoma”. Pero de sencillo no tiene nada. Una cita del polímata y

científico Henri Poincaré nos puede dar una idea de por qué no es tan sencillo. Decía Poincaré: “la ciencia es hechos; de la misma manera que las casas están hechas de piedras, la ciencia está construida de hechos; pero un montón de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia” (citado en Cerejido, 2004: p. 74). Es decir que un gen es una piedra, pero si queremos tener una idea de lo que es el genoma humano, nos topamos con una tarea mucho más difícil que juntar ladrillos en una bolsa, por varios motivos. Más allá de las dificultades (que son muchas) para establecer el genoma humano, podemos decir que no es únicamente un conjunto de genes.

El primer genoma completo que la humanidad logró dilucidar es el de una bacteria; la *Haemophilus influenzae* en 1995 (Fleischmann et al., 1995). Pero ya en 1984, había comenzado el Proyecto Genoma Humano, cuyo objetivo era el que su título ostenta, es decir, la resolución de todo el código genético, de todas las secuencias de nucleótidos del ADN humano. Obtener los 20.000 a 25.000 genes que contiene. Escribir los 23.000 libros que existen en el interior de cada célula de un humano. Para darse cuenta de la magnitud de la tarea a realizar, basta saber que es recién en abril del 2006 cuando el genoma humano se completa, al terminar la secuenciación del último cromosoma, paradójicamente el cromosoma número 1 (Gregory et al., 2006). Es decir que hizo falta la colaboración de miles de científicos, de una organización dedicada enteramente a coordinar información, de un financiamiento de miles de millones de dólares, y de mucha tecnología para completar el gigantesco emprendimiento de secuenciación del genoma humano completo.⁷

Los avances en la tecnología de secuenciación y búsqueda de genes fueron enormes, y este desarrollo fue una de las claves para que este

7 Ver <https://www.genome.gov/human-genome-project>

proyecto pudiera ser concluido. Pero solo una de las claves. Recordemos: el genoma no es solamente un conjunto de genes. Por ejemplo: un problema que surge inmediatamente a partir de grandes acumulaciones de datos es cómo administrarlos y dónde almacenarlos. Estos conflictos son relativos a la ciencia y a la humanidad desde hace mucho tiempo, y su resolución vino de la mano de la informática; del progreso tanto de los procesadores de alta velocidad como de los discos de gran capacidad de almacenamiento. Todos sabemos que esto ha sido una de las revoluciones de los últimos años en miles de aspectos de la vida diaria. Pero, en particular en las ciencias biológicas, ha dado lugar a una disciplina en sí misma, que es la bioinformática. Es decir, la informática puesta al servicio de problemas biológicos de manejo de información. Actualmente, se dicta como materia en muchas universidades, y existen miles de científicos y profesionales especializados en esta nueva disciplina cuya complejidad y alcance no solo es enorme, sino que crece minuto a minuto.

En informática se ha desarrollado una solución para la administración de gran cantidad de datos. Son varios los problemas que comienzan a aparecer cuando las cantidades acumuladas son verdaderamente grandes: falta de espacio, datos duplicados o perdidos, problemas en el acceso a dichos datos, etc. El desarrollo informático de bases de datos permite la administración de prácticamente cualquier cantidad de datos. Una base de datos no es una sencilla biblioteca digital, sino muchísima información articulada y estructurada de tal manera que permita la recuperación de la información que uno necesita con precisión y, a su vez, evita tanto la duplicación como la pérdida de datos (Luscombe, Greenbaum y Gerstein, 2001).

Por otro lado, hoy en día estamos en un mundo globalizado, y el acceso a la información es relativamente sencillo. Internet ha permitido vincular el mundo instantáneamente y ha modificado a la humanidad entera en

casi todos los aspectos; si esta revolución es algo positivo o no, escapa a cualquier análisis nuestro; pero sí queremos dejar en claro que su aparición permitió completar la idea del manejo de datos: no solo podrán almacenarse infinita cantidad de datos, sino que vamos a poder obtenerlos desde cualquier parte del mundo en un instante. La bioinformática ha desarrollado lo que se conoce como “sistema gestor de base de datos” (SGBD), un conjunto de programas que median la intervención entre el usuario y las bases de datos en sí. Por ejemplo, si hoy en día alguien quiere acceder a la secuencia de un determinado gen, no tendrá mucha dificultad en lograrlo, pero nunca interaccionará directamente con el sitio en donde la información cruda se encuentra. Los sistemas gestores de bases de datos logran la *universalidad* de la información, ya que interpretan lo mejor posible lo que el usuario quiere recuperar de la base de datos.

Otro aspecto de suma importancia es que los gestores de bases de datos se encuentran virtualmente separados de las bases de datos. Solo acceden a ellas a pedido de un determinado usuario, lo cual permite que no haga falta apagar un servicio para agregar información. Anteriormente, esto era un problema bastante importante. Muchas veces hemos querido acceder a una página web y nos resultó imposible porque la página estaba siendo actualizada. Si esto fuera así para una base de datos, nunca podría estar actualizada, ya que los usuarios son miles en todo el mundo y se la utiliza de forma continua. Con los SGBD, la separación entre las bases de datos y los SGBD permite que la información permanentemente sea agregada sin que el usuario lo perciba. Las bases de datos en ciencia crecen continuamente por agregado de material digital, pero los SGBD nunca interrumpen su funcionamiento.

Volvamos hacia atrás para no perder la idea de lo que se intenta explicar: la secuencia nucleotídica del ADN humano (y de cualquier otro ser vivo). Una vez logrado el desarrollo de la tarea, además se tendría que poder recuperar la información averiguada; saber en qué parte del genoma se

encontraba para poder utilizarla con un fin que no fuera el mero alcance de un objetivo, sino como algo que aportara a la expansión de nuestro conocimiento de la vida. ¿De qué sirve un libro que no podemos leer? Pero si la secuencia nucleotídica son los ladrillos de la casa, entendemos ahora que la bioinformática, con sus bases de datos y SGBD, son los cimientos y la estructura en la que se construye la casa. Es aquí cuando podemos recién introducir el término que tanto buscábamos: “genómica”. Creemos que de nada serviría definirlo sin antes haber dejado en claro qué herramientas y conocimientos hicieron falta para su surgimiento. Obsérvese que a la palabra “genoma” ya definida, se le ha agregado el sufijo “ómica”. Y es justamente este sufijo el que verdaderamente nos interesa que quede claro (más que el término “genómica”); ya que en los últimos años se ha comenzado a agregar a diversos sustantivos que denotan disciplinas y han surgido las otras ciencias ómicas. En nuestro caso especial, nos van a interesar aquellas que se han desarrollado a partir de los adelantos en EM y las que están vinculadas a esta tecnología.

Pero ¿qué es la genómica?, ¿cuál es la diferencia entre la genética y la genómica?, ¿cuál es la diferencia entre el genoma y la genómica? De todo lo anterior surgen las respuestas: por ejemplo, en una visión bastante reduccionista, la genética estudia genes. Esto lo decimos sin desmerecer la genética, sino más bien para aclarar los distintos marcos teóricos de las disciplinas que se discuten. A un genetista le interesa un gen que codifica para una proteína en particular, al cual, en su estudio, lo separa de forma abstracta de su entorno nuclear. Veamos un ejemplo ilustrativo de cómo funciona y se entiende la genética, para luego poder comprender la diferencia con la genómica. De paso, conoceremos una enfermedad en particular y un poco de historia de la bioquímica.

En la sangre existen células especializadas en transportar oxígeno, conocidas como “eritrocitos”. Dentro de los eritrocitos, existe una proteína muy especial, la ya presentada hemoglobina. Como dijimos, esta proteína

se encarga del transporte del preciado oxígeno a cada una de las células de nuestro organismo. Si, por algún motivo, la cantidad de glóbulos rojos sanos o de hemoglobina disminuyen demasiado, comenzamos a padecer una enfermedad llamada “anemia”, que se caracteriza síntomas como la aparición de cansancio, vértigo, palidez, etc. La anemia no es una única patología, sino que existen diversas variedades con etiologías distintas.

En 1949, Linus Pauling y su equipo estudiaron una anemia en particular, conocida como “anemia falciforme”. Esta anemia afecta sobre todo a la población de la zona ecuatorial de África. Se caracteriza por tener eritrocitos con una forma anormal: una forma de hoz, como la de la herramienta se utilizaba para segar el trigo. La forma normal de un eritrocito es la de una almohada circular en donde una persona hubiese apoyado la cabeza toda la noche (la descripción correcta es la de un disco bicóncavo). Con la forma anómala de hoz, los eritrocitos son más rígidos y cuando los vasos sanguíneos son muy pequeños pueden quedar como tapones, lo que impide la circulación normal de la sangre, produciendo así dolores en extremidades e infartos de las zonas afectadas, junto a la condición de anemia. Esto hace que la expectativa de vida de la gente enferma llegue a los 40-60 años; y hasta el momento no se ha encontrado una cura. Linus Pauling y su equipo descubrieron, a través de la técnica conocida como “electroforesis” (que se puede utilizar para distinguir distintas proteínas), que la forma de hoz de los eritrocitos defectuosos era causada únicamente por la presencia de una hemoglobina defectuosa, distinta a la normal, llamada hemoglobina S. No dudaron en llamarla una “enfermedad molecular” (Pauling et al., 1949), ya que toda la patología era consecuencia de una proteína mal sintetizada. En la época en que Pauling postula el hallazgo de la primera enfermedad molecular, postulado que luego se demostró cierto, todavía no existía forma de averiguar la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿Quién fue la persona que logró proponer la primera secuencia de aminoácidos de una proteína? No podemos dejar de asombrarnos y hacer un breve

paréntesis histórico. Frederick Sanger en 1953 termina de dilucidar la secuencia y estructura de la insulina (una proteína muy pequeña que se la clasifica como “péptido”) (Sanger y Thompson, 1953). Esto es el comienzo de las técnicas para determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas, y le valió su primer Premio Nobel en Química en 1958, luego de un enorme y largo trabajo de ocho años para determinar la estructura de la insulina. Lo que resolvió Sanger fue un verdadero rompecabezas químico; y es muy interesante que lo que a él le valió un premio Nobel luego de ocho años de trabajo intenso y perseverante, hoy en día, un espectrómetro de masa lo puede resolver en un par de horas. Como ya mencionamos, Sanger se dedicó luego a la determinación de la secuencia del ADN, desarrollando exitosamente la técnica de secuenciación que lleva su nombre, y que continúa utilizándose hoy en día de forma rutinaria en miles de laboratorios de todo el mundo.

Los hallazgos de estas dos personas, tanto Frederick Sanger como Linus Pauling, son justamente de aquellos hallazgos que mencionábamos en un comienzo: ciencia que cambia el mundo. El mundo fue distinto a partir de ellos. Comenzamos a agregar nuevos significados a la palabra “vida”; nos adentramos en sus misterios como nunca antes en la historia de la humanidad había ocurrido. Por esto creemos que el lector debería comenzar a retener este par de nombres si no los conoce, ya que tienen una trascendencia que va mucho más allá de la bioquímica o de la química biológica. Afectan la religión, la sociedad y el arte. Ambos poseen dos Premios Nobel: Frederick Sanger recibe los dos en el mismo campo, la química; mientras que Linus Pauling, a su vez, recibe un premio por sus trabajos científicos en química y un Premio Nobel de la Paz por presionar continuamente para terminar logrando (con una petición firmada por once mil científicos) el cese de las pruebas nucleares que se estaban llevando a cabo durante el período de la Guerra Fría. Su declarado pacifismo en esos tiempos de Guerra Fría llevó a que el gobierno de los Estados Unidos le quite su pasaporte desde 1952 hasta 1954, lo

cual lo separó de la comunidad científica con el objetivo de evitar su acceso a información vital para el planteo de la estructura del ADN.

Esta estructura fue dilucidada por Watson y Crick en la Universidad de Cambridge, en 1953, gracias al acceso a tres fuentes. La primera, información que Pauling no tenía; la segunda, información que obtuvieron del propio hijo de Linus Pauling acerca de su trabajo de investigación; y, la tercera y fundamental, el acceso a datos experimentales de rayos X de cristales de ADN obtenido en el laboratorio del King's College de la Universidad de Londres. Este último acceso no fue autorizado por la investigadora que los había obtenido, Rosalind Franklin. Efectivamente, diez años después de la muerte de Franklin, en 1968, Watson (citado en Maddox, 2003) escribió con todo desparpajo en su *best-seller*: “Rosy, por supuesto, no nos dio sus datos directamente. En este asunto, nadie del King's College sabía que esos datos estaban en nuestro poder”. Como vemos, la falta de ética también impregna la mente de científicos brillantes, quienes, en su desmedida ambición por publicar resultados de alto impacto, los que eventualmente pueden derivar en premios prestigiosos como el Nobel, no ponen reparos en hurtar datos experimentales meticulosamente obtenidos por otros colegas.

Watson y Crick también dieron lugar a otras polémicas. Ellos bautizaron como “biología molecular” a la naciente subdisciplina de la bioquímica derivada de su descubrimiento de la estructura del ADN y de los descubrimientos posteriores (tales como que el ADN es el molde para la fabricación de proteínas). Un famoso bioquímico de la época, Erwin Chargaff⁸, fue muy crítico de esta nueva subdisciplina (y quizás

8 Erwin Chargaff demostró que, en todo ADN, la cantidad de A equivale a la de T, y la C a la de G; uno de los descubrimientos cruciales para la postulación posterior de la doble hélice.

también del nombre) al sostener que la biología molecular equivalía a la práctica de la biología sin tener licencia para ello. Proponer que la biología molecular sea la explicación de la biología a nivel molecular parecía a Chargaff un objetivo un tanto pretensioso. Por otro lado, en cuanto al nombre, la expresión “biología molecular” parece un oxímoron.⁹ En la jerga de la EM, usamos el oxímoron “alto vacío” para referirnos a la muy baja presión con la que trabajan los espectrómetros de masa. En la poesía también suele usarse este recurso. Por ejemplo, Peteco Carabajal escribió en su chacarera “Entre a mi pago sin golpear”: “cantor para cantar, si nada dicen tus versos, ¡ay! para qué, vas a callar al silencio”. *Callar al silencio...* muy lindo.

Ahora volvamos a nuestra anemia falciforme con sus eritrocitos en forma de hoz y su hemoglobina defectuosa. ¿En qué consistía, químicamente, el problema con la hemoglobina S de la anemia falciforme?, ¿por qué era una hemoglobina “distinta”? La hemoglobina es una molécula más compleja y grande que la insulina. En realidad, está formada por cuatro proteínas llamadas “globinas”. Dos de ellas son idénticas y se llaman “alfa” (α), y las otras dos globinas, también idénticas entre sí, se llaman “beta” (β). La unión de las cuatro globinas forma la estructura proteica conocida como “hemoglobina”. La globina alfa es una cadena formada por 141 eslabones (aminoácidos), mientras que la cadena beta está formada por 146 aminoácidos. Bastante tiempo después de los descubrimientos de Pauling, se logró hallar las respuestas a las preguntas de arriba. Ahora se sabe que la gente con anemia falciforme presenta la cadena de la globina beta distinta a la de la gente con hemoglobina normal. ¿En qué consiste esta anormalidad? Esto también se logró responder con muchísima precisión. El sexto eslabón de la cadena de la globi-

9 “Oxímoron”, palabra muy usada por la antropóloga forense de ficción de la serie televisiva *Bones*.

na beta no es el correcto. En lugar de hallarse un aminoácido conocido como “glutamato”, aparece otro aminoácido denominado “valina”.

Obsérvese la sutileza química de esta enfermedad, la primera enfermedad molecular conocida. En una cadena de 146 eslabones, un aminoácido distinto, uno solo, puede traer consecuencias terribles. Esto es lo que se conoce como “proteína mutada”; justamente, una proteína que no tiene la secuencia correcta de aminoácidos. El aminoácido cambiado trae aparejado que, cuando la hemoglobina no transporta oxígeno, se deposite en forma de filamentos cuyo tamaño y rigidez deforman el glóbulo rojo, que ya no puede pasar a través de los capilares más pequeños del cuerpo para terminar su recorrido (Stern y Gaucher, 2015). Para llegar a la conclusión, recordemos que es una enfermedad hereditaria, que se puede transmitir de padres a hijos: el problema no se encuentra en la síntesis de la proteína, sino en la información genética del individuo. Se podría encontrar el gen, la pequeña porción del ADN, que tiene la información para sintetizar la globina beta. El problema debería estar ahí, ya que esta enfermedad está relacionada a la herencia. El error fue hallado: el gen que posee la información para sintetizar la cadena β de la hemoglobina se encuentra en el cromosoma 11, y se halló que donde debe decir “GTA”, en los casos de la gente con anemia falciforme dice “GTG” (Devlin, 2008). Es decir, un único cambio de un nucleótido por otro es traducido en un error en la síntesis de una proteína, que se manifiesta en una enfermedad en la cual los glóbulos rojos pierden su capacidad elástica. Esto trae aparejado diversos síntomas, entre ellos la anemia; así, una mutación en el ADN se convierte en una enfermedad hereditaria, muchas veces, mortal.

Así trabaja la genética clásica. Y pronto, a partir del trabajo de Linus Pauling comenzó a buscarse un gen para todo: tanto para la anemia falciforme como para el alcoholismo. Cualquier característica de nuestro comportamiento se suponía vinculada a un gen. Y así nació el Proyecto Genoma Humano. Ahora bien, el Proyecto Genoma Humano ya está

terminado, y es momento de hacernos una pregunta tan obvia como importante: ¿qué hacemos con toda esa información?

A partir de esta pregunta nace la genómica. La genómica es ampliar el foco de estudio, salir del gen individual y estudiar el comportamiento de toda la información genética. Porque hay algo que creemos que ocurre a partir de fines del siglo XX: la cantidad de información reunida hoy en día es enorme. Todo indica que cada vez tenemos más preguntas acerca de la vida y del funcionamiento de una célula que respuestas descubiertas. En cada lugar de una célula de un tejido, de un órgano, de un individuo, de una especie, encontramos más y más complejidad. Y eso es una de las primeras cosas que comienza a revelar la genómica: la vida es mucho más compleja de lo que pensábamos. Como dijo el biólogo Lyall Watson: “si el cerebro fuera tan simple que pudiéramos entenderlo, seríamos tan simples que no lo entenderíamos” (citado en Maldonado, 2019: p. 4). Así, la genómica es el manejo de una enorme cantidad de información genética obtenida a través de las más modernas técnicas de secuenciación de genes. Dicho manejo solo es posible gracias a la informática actual, que permite tanto el almacenamiento como el análisis de toda esa información.

La genómica responde preguntas distintas a las que respondería la genética clásica: mientras esta centraba la mirada en un único gen o grupo de genes, la genómica amplía la visión hasta alcanzar cuestiones más profundas y difíciles de responder, que van desde la evolución hasta la medicina y la farmacología personalizada. ¿Todas las personas presentan el mismo genoma?, ¿cuál es la diferencia? ¿Cómo se maneja la información contenida en el ADN? ¿Podemos separar a la humanidad en poblaciones de acuerdo a sus genomas? ¿Cuál es la diferencia entre el genoma de un caballo y el de un ser humano? ¿Tenemos información compartida con las levaduras o con las plantas? ¿Cuáles son los genes más antiguos? ¿Podemos deducir para qué sirve un gen sin saber qué proteína codifica? Así, se espera, por ejemplo, que la genómica permita llegar a una medicina y

a una farmacología diseñadas a la medida del genoma único de una persona. Esta idea hipocrática de tratar a cada individuo como una entidad individual, idea tan antigua, es ahora una promesa de la genómica.

Quizás la tecnología clave en el rápido avance del Proyecto Genoma Humano haya sido la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*, por su sigla en inglés: PCR), revolucionaria invención que facilitó los trabajos de secuenciación del ADN. La técnica de PCR fue reconocida por el Comité Nobel en 1993: la mitad del Premio Nobel de Química de ese año fue otorgado a su inventor y desarrollador, el norteamericano Kary Banks Mullis, quien falleció en 2019. Es interesante mencionar que a Kary Mullis el trabajo rutinario de laboratorio lo aburría y, además, fue un escéptico y crítico de la ciencia. Su invento no se le ocurrió en un laboratorio, rodeado de muestras, equipos especializados y computadoras. Todo lo contrario. Según su relato, la invención de la PCR sucedió mientras manejaba su automóvil desde San Francisco a Mendocino. Manejar automóviles sí lo divertía. Este es un ejemplo que muestra que el cerebro humano y su creatividad son la más poderosa herramienta científica conocida hasta la fecha.

Como se ve en este libro, la invención de una técnica o la formulación de una teoría es muchas veces motivo de controversia acerca de quién fue su verdadero artífice y sucede también que muchas veces a mucha gente se le ocurre lo mismo en el mismo momento, pero en distintos lugares. Quizás uno de los ejemplos más famosos sea el de la invención de la tabla periódica, realizada por Dmitri Mendeléyev en Rusia en 1869 y por Lothar Meyer en Alemania en 1870.¹⁰ A veces, incluso, se demues-

10 Enseñanza recibida en 1977, mediante una pregunta desafiante, por uno de los autores de esta obra de parte del profesor de Química de cuarto año del Colegio Nacional N° 1 de San Salvador de Jujuy, el brillante y muy apreciado profesor “Fiero” García.

tra posteriormente que la misma idea se le había ya ocurrido a otro científico, pero algunos años atrás, y al no haber tenido trascendencia, esta idea permanece en el olvido hasta que la ciencia está en condiciones de explotar toda su potencia. La invención de la PCR es uno de estos casos. Mullis mencionaba siempre a otro Premio Nobel anterior, uno de los galardonados con el Nobel de Medicina en 1968, Har Gobind Khorana, como antecesor de sus ideas. Otro ejemplo de cómo trabaja la ciencia: el conocimiento no se genera de la nada, el conocimiento casi siempre se construye con base en conocimientos previos.

Vayamos ahora a una descripción somera de la técnica. La PCR es una forma de amplificación. Como ejemplos de formas de amplificación de la vida cotidiana tenemos los amplificadores de audio y los polígrafos. Los primeros reciben una señal sonora pequeña y pueden amplificarla hasta que se escuche en todo un estadio. Un polígrafo puede tomar las pequeñas señales eléctricas creadas por las células del corazón o del cerebro y amplificarlas hasta hacerlas visibles en un trozo de papel. Estos son los estudios conocidos como electrocardiograma y electroencefalograma, respectivamente.

La técnica de PCR toma una sola parte del ADN (la que se pretende estudiar) y la transforma en miles y miles de copias exactamente iguales. Así, cantidades indetectables de ADN se transforman, gracias a esta técnica, en cantidades enormes. Para comprender su funcionamiento básico hay ciertas cosas adicionales que debemos aclarar acerca de la estructura del ADN. Si bien mencionamos la molécula de ADN como una sola, esto no es tan así, ya que está formada por dos cadenas llamadas “hebras”, que se enroscan como una escalera en espiral o un sacacorchos. Esta es la famosa doble hélice del ADN, la que quizás sea la imagen más icónica de un modelo científico de las últimas décadas.

Como se explicó anteriormente, los monómeros que forman la hebra o cadena del ADN son solo cuatro: adenina, guanina, timina y citosina. A estos compuestos (que químicamente se los conoce como “bases nitrogenadas”) se los designa, para facilitar el manejo de la enorme información de un genoma, a través de sus iniciales: A, G, T, C. Una posible secuencia para una hebra de ADN podría ser: A-T-A-A-C-C-A-G-T, por ejemplo. Al unirse dos hebras para formar la doble hélice del ADN, no lo hacen de cualquier forma, sino que la adenina siempre se enfrenta a la timina, y la citosina, a la guanina.¹¹ El apareamiento A-T y C-G se llama “complementariedad del ADN”, y uno de sus corolarios es que con cualquier hebra se puede construir la otra. Entonces, ¿cómo será la hebra complementaria a la secuencia dada arriba como ejemplo? Se sabe también que el ADN se duplica en el núcleo de la célula gracias a una proteína con actividad enzimática conocida como “ADN polimerasa”. Esta enzima trabaja solamente sobre una hebra del ADN y necesita de un pequeño trozo de unos pocos monómeros, conocido como “cebador” (del inglés, *primer*). La palabra hace referencia a que, justamente, el “pegado” de este pequeño polímero es la señal para que la enzima ADN polimerasa comience a sintetizar la cadena complementaria.

Esto es muy coherente con la idea de una duplicación regulada del ADN; de otra forma, la enzima mencionada sintetizaría cualquier ADN de una sola hebra con el que se encontrara, y eso no sería compatible con ningún proceso fisiológico celular en general. La ADN polimerasa es capaz de reconocer esta pequeña secuencia de cebador, unirse a la única hebra de ADN y comenzar a agregar monómeros uno a uno, eslabón a eslabón, y siempre copiando la cadena molde, realizando una

11 Para recordar estos hechos bioquímicos, los estudiantes universitarios argentinos inventaron hace muchos años atrás las expresiones mnemotécnicas tangueras “Anibal Troilo” y “Carlos Gardel”.

suerte de lectura de la hebra original. Si encuentra una base de A, agregará una T a la cadena nueva que está sintetizando. Además, el cebador está preparado de tal manera que se une, únicamente, al gen que se quiere amplificar. No importa cuánto ADN exista y que no nos interese, el cebador debería unirse solo al gen que nos interesa.

Con todo esto en claro, ahora sí podemos entender en qué consiste la técnica de PCR. Cabe aclarar que todo lo escrito hasta aquí es una visión muy simplificada y abreviada; estamos reduciendo temas muy complejos intentando ganar con esto una facilidad de comprensión por parte del lector; esperamos que esta pérdida de profundidad y riqueza, se vea beneficiada con una clara comprensión de lo expuesto.

Vamos a reducir lo que se conoce como “ciclo” de una PCR, a solo tres pasos:

1. Desnaturalización

Es un proceso de pérdida de estructura y separación de las dos cadenas, en el que sometemos la muestra (que tiene muy poca cantidad de ADN para amplificar) a un calentamiento cercano a los 90° C. Con este aumento de temperatura, logramos separar las dos cadenas del ADN.

2. Alineamiento y unión del cebador

Se disminuye la temperatura. Al hacer esto, el cebador se une a cada uno de los extremos de las dos cadenas del ADN ya separadas. ¿Y a qué temperatura? Esta es una pregunta que requerirá cierta investigación para cada ADN que se quiera amplificar. En esta etapa, también la polimerasa se une a cada una de las cadenas separadas en el paso previo.

3. Elongación

Ahora la polimerasa comenzará a crear la nueva cadena complementaria a cada hebra de ADN que se ha desnaturalizado en el paso 1. Cada una se extenderá desde extremos opuestos, pero realizando el mismo trabajo: agregar eslabones a la cadena.

En la figura 12 presentamos gráficamente estas tres etapas y el resultado final de un ciclo de PCR. Obsérvese que, luego de la elongación a baja temperatura, el resultado son dos moléculas de ADN, es decir que de dos hebras originales obtuvimos cuatro, el doble. Si repetimos el ciclo una segunda vez, obtendremos un total de ocho hebras de ADN. Y un tercer ciclo daría por resultado 16 hebras de ADN. Como puede observarse, el proceso es exponencial, ya que en cada ciclo se duplica el número de hebras del ADN.

En una aplicación típica de PCR suelen realizarse alrededor de treinta ciclos de aumentos y descensos de temperaturas. Parece poco significativo, sin embargo, al hacer los cálculos nos damos cuenta de que la cantidad de ADN obtenida es asombrosa. Por ejemplo, si partimos de solo una molécula de ADN, es decir de dos hebras, el cálculo sería: 2^{30} . El resultado, la multiplicación de dos por sí mismo treinta veces, es de 1.073.741.824 hebras de ADN. Es decir que si amplificáramos 2 mg de ADN obtendríamos más de 1 millón de g de ADN. Esta es la enorme potencia de la técnica para lograr grandes cantidades de ADN partiendo de concentraciones ínfimas, con las cuales sería imposible trabajar.

Ahora, ¿qué significa la expresión “Taq-polimerasa” que observamos en la figura 12? Este nombre hace referencia a una polimerasa aislada de bacterias que crecen en condiciones extremas (las así llamadas “extremófilas”), en este caso en aguas termales donde resisten temperatura elevadas. Estas bacterias fueron bautizadas *Thermus aquaticus* por su descubridor, Thomas D. Brock. De acá entonces el nombre “Taq-polimerasa”, la cual que puede resistir los 90 °C de la primera etapa de una PCR.

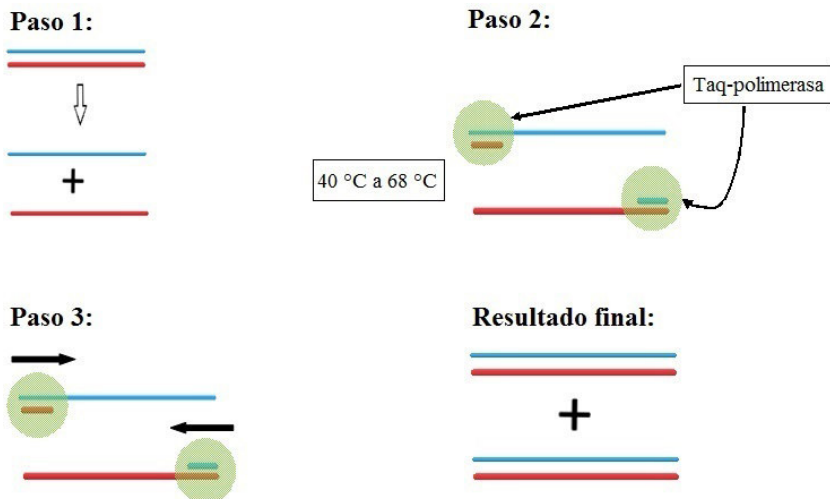


Figura N.º 12. Ciclo de una PCR y resultado final.

Fuente: elaboración propia.

Unas palabras sobre las extremófilas. Estas son bacterias que, como indica su nombre, pueden resistir condiciones ambientales extremas, donde usualmente no es razonable suponer que exista alguna forma de organismo vivo. Estas bacterias han sido encontradas en diversos ambientes extremos: aguas termales, aguas termales ácidas, salinas, profundidades de fosas marinas donde soportan elevadísimas presiones, etc. Para poder sobrevivir en esos medioambientes extremos, las extremófilas han desarrollado diversas estrategias adaptativas resultantes en una serie de modificaciones bioquímicas, en comparación con organismos similares que crecen en medios corrientes. Por ejemplo, en el ARN de estas bacterias se encuentran, aparte de las bases nucleotídicas normales A, C, G y U (esta última reemplaza a la T del ADN), una serie de bases nucleotídicas modificadas de estructura muy variada, características de cada bacteria. Este conjunto de estructuras modificadas puede encontrarse en una base de datos de la Universidad Estatal de Nueva York (Albany), base que es continuamente actualizada con nuevas estructuras aportadas por inves-

tigadores de todo el mundo.¹² Uno de los autores de este trabajo participó en el descubrimiento de una C con modificaciones en su estructura, la que se encuentra publicada en dicha base de datos.

(<https://mods.rna.albany.edu/mods/modifications/view/107>)

Volvamos ahora al mundo de las disciplinas ómicas. ¿Qué significa el término “ómica”? En principio, se trata de un neologismo, es decir, de una palabra nueva creada para un nuevo concepto (muchas palabras como “ovni”, “robot”, “clon”, “autopsia” fueron neologismos hace muchos años, hasta que con su uso continuo dejaron de serlo para pasar a pertenecer al idioma español). El término, como muchos otros, es derivado de una traducción del inglés: *omics*. Por ejemplo, si agregamos el sufijo a “gen” tenemos la “genómica”, una nueva disciplina que, como ya se explicó, maneja no uno o unos pocos grupos de genes, sino su totalidad. Observemos entonces que es el propio eje de lo que se está estudiando lo que cambia: de estudiarse un gen que está en todas las personas, pasan a estudiarse todos los genes que se encuentran en un individuo.

Se ha explicado, en relación a la genómica y a la genética, que un gen es la información necesaria para construir una proteína, por lo tanto, para cada gen existe una proteína, de lo que se puede aceptar fácilmente que el número de proteínas diferentes de un individuo puede ser extremadamente grande. Entonces podríamos pensar en aplicar los mismos criterios que definen la disciplina genómica, pero ahora vinculado al mundo de las proteínas. Así podríamos definir ahora, lo que se conoce como “proteómica” (Anderson y Anderson, 1998). Como el lector podrá imaginar, las dos disciplinas están extremadamente vinculadas, y el estudio de una nos lleva al estudio de la otra. Ahora bien, recordemos que para que haya sido posible la genómica fue necesario recopilar

12 Ver <https://mods.rna.albany.edu/>

grandes cantidades de información proveniente de la secuenciación de todos los genes de un individuo (genoma).

Para poder desarrollar la proteómica, necesitaríamos identificar, caracterizar y, de ser posible, cuantificar todas las proteínas provenientes de una muestra. Es aquí donde las fuentes de ionización ESI y MALDI (descriptas en el capítulo 1) aparecen hacia fines de los 80 del siglo XX y revolucionan el campo de la bioquímica en general, lo que permite el desarrollo de nuevas disciplinas ómicas en particular. Podemos afirmar que son dos las técnicas analíticas que han permitido el surgimiento contemporáneo de tantas ciencias ómicas: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la EM.¹³ Así fue como, a partir de 2002, las disciplinas -ómicas comienzan a levantar vuelo. Por un lado, la bioinformática ya tiene todo el manejo de bases de datos y enormes cantidades de datos; por otro, las nuevas fuentes de ionización permiten tener en fase gaseosa moléculas de alto peso molecular, y ser susceptibles de, por ejemplo, ingresar en un triple cuadrupolo o en un TOF. Estas tecnologías nos permiten ahora estudiar sistemas de una complejidad muy grande gracias a la gran cantidad de señales capaces de detectar; así han surgido nuevos desafíos como la proteómica, la transcriptómica o la metabolómica, que es la que nos interesa.

13 La RMN no será un motivo de discusión en este libro, solo mencionaremos, en primer lugar, que su desarrollo y eventual aplicación en el análisis de muestras complejas se debe mayormente al procesamiento informático que hoy se puede obtener de la señal de RMN, y, en segundo lugar, la gran ventaja de esta técnica frente a la EM: no tener que procesar la muestra ni requerir de ningún proceso de separación cromatográfica. En este contexto debemos mencionar que Kurt Wüthrich fue galardonado con la mitad del Premio Nobel de Química de 2002 por su desarrollo de la espectroscopía de RMN para la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas en solución (la otra mitad del premio fue dividida en partes iguales para investigadores del campo de la EM, con un aspecto polémico que discutiremos en el capítulo 3).

Para comprender qué es la metabolómica, una vez que el término “ómico” ha quedado comprendido, es necesario entender qué es el metabolismo:

el metabolismo se refiere a todos los procesos físicos y químicos del cuerpo que convierten o usan energía, tales como: respiración, circulación sanguínea, regulación de la temperatura corporal, contracción muscular, digestión de alimentos y nutrientes, eliminación de los desechos a través de la orina y de las heces, funcionamiento del cerebro y los nervios. (Shulman y Petersen, 2017: p. 1039).

Esta es una definición que también se encuentra en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. Se puede observar que es una definición muy breve de un concepto muy amplio, que roza con la inabarcable idea de la vida. Es muy complicado comprender todos los procesos bioquímicos que ocurren continuamente en nuestro organismo. La información que se ha ido acumulando es verdaderamente difícil de asimilar, basta mirar la figura 13 para coincidir con esta afirmación. En esta figura mostramos el mapa metabólico más actualizado hasta la fecha según la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).¹⁴ Allí encontraremos bases de datos para la comprensión de funciones de alto nivel, como así también herramientas y utilidades de sistemas biológicos complejos como la célula, los organismos o los ecosistemas. Como podemos observar, se trata de un gráfico sumamente complejo; cada punto hace referencia a una reacción química catalizada que

¹⁴ Ver <https://www.genome.jp/kegg/>

ocurre en el organismo, mientras que los distintos colores indican el conjunto de vías de reacciones vinculado a un metabolito en particular (por ejemplo: síntesis y degradación de glucosa).

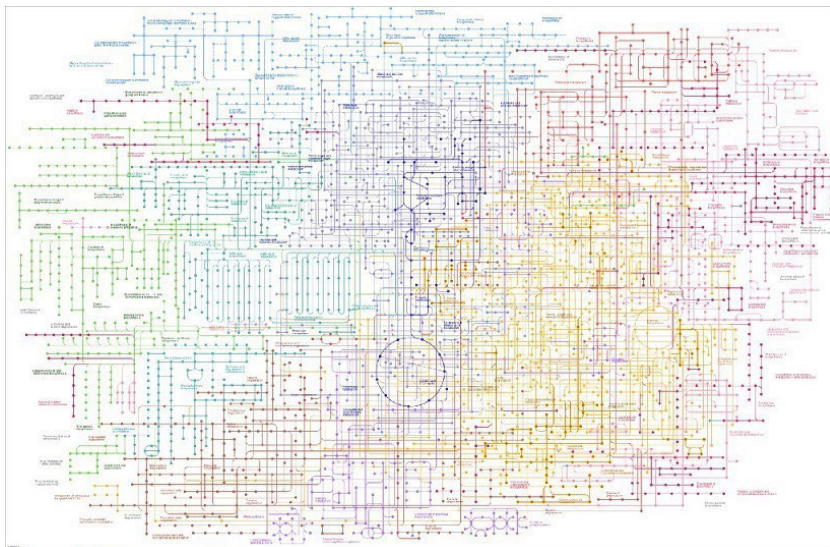


Figura N.º 13. Mapa metabólico.

Fuente: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa y Goto (2000); con permiso).

Tenemos que pensar que el mapa metabólico está superpuesto con un mapa genómico, un mapa de señalización, un mapa del sistema inmune, un mapa del sistema endocrino. Todo indica que recién ahora, en el siglo XXI, comenzamos no a comprender, sino apenas a darnos cuenta de la enorme complejidad que implica la palabra “vida”. Comprender el funcionamiento de una célula, a nivel de la información disponible hoy en día, es sin lugar a dudas una tarea prácticamente sobrehumana.

Así como la genómica estudia el genoma como un todo, la metabolómica estudia el metaboloma. El metaboloma es el conjunto de metabolitos (así como el genoma era el conjunto de genes) que se encuentra en el organismo. Un metabolito es cualquier molécula pequeña que se encuentre dentro del organismo. Suelen ser intermediarios en procesos de transformación química. Como se ha mostrado en el esquema metabólico de la figura, los procesos son muchos y por cada uno de los puntos que se muestra existe un metabolito. Las nuevas tecnologías de EM y RMN han permitido hallar miles de ellos y su número va en aumento. En la Human Metabolome Database (HMDB), base de datos del metaboloma humano, se encuentran 114.007 metabolitos hasta la fecha, de distintos tipos y con muy distintas funciones. Esta base de datos posee un sencillo gestor que nos permite ubicar cualquier metabolito registrado y obtener muchísima información sobre este.¹⁵

Y así como existe el Proyecto Genoma Humano, también existe, como pariente cercano, el Proyecto Metaboloma Humano.¹⁶ La ambición de este proyecto reside en identificar todos los metabolitos del metaboloma humano. Este parece ser un objetivo más ambicioso que el de su pariente genético. Por ejemplo: parecería ser algo mucho más abierto cuyo fin se desconoce. El genoma tenía un principio y un final, solo había que encontrar el orden de todas las bases nucleotídicas del ADN, sería un trabajo titánico y prolongado, pero se podía vislumbrar su final, con la idea colocada en que, si una pequeña parte del ADN puede ser leída, a la larga, todo el lenguaje encerrado en esa molécula podría ser determinado.

Sin embargo, nadie tiene idea de cuántos metabolitos existen en el organismo. El concepto de metaboloma es muchísimo más dinámico.

15 Es de acceso gratuito y fácil manejo, tal como se puede ver en <http://www.hmdb.ca/>

16 Ver <http://www.wishartlab.com/projects/the-human-metabolome-project>

Varía con factores ambientales, con factores psicológicos, y ni que hablar de los factores nutricionales. Además, tendremos distintos metabolitos de acuerdo al origen de la muestra: no será lo mismo si proviene de orina, plasma o líquido cefalorraquídeo. Esto nos lleva a aclarar que distintos tejidos tienen distintos metabolomas en distintas partes del cuerpo; así que nos enfrentamos a un conjunto de pequeños compuestos que no parecerían tener un universo de valores determinado de antemano. Nuestro metaboloma está cambiando minuto a minuto, ya que es el resultado de miles de reacciones químicas (algunas de las cuales se muestran en la figura 13).

Pero si es posible pensar en el metaboloma, eso ha sido posible gracias al desarrollo de la EM; más particularmente a las modernas técnicas de ionización. La tecnología de UHPLC acoplada a la EM permitió, sobre todo, la identificación y cuantificación de moléculas de muy baja concentración en sangre como ninguna otra técnica podía detectar. Las técnicas de detección bioquímicas anteriores permitían detectar un compuesto o un grupo reducido del mismo tipo de compuesto por compartir características en común. Así, técnicas como UHPLC-MS/MS permitieron que la idea de metaboloma pudiera desarrollarse de la misma manera que con anterioridad las técnicas de secuenciación y PCR permitieron pensar en un genoma. Y nuevamente: Henri Poincaré. Ya nos habíamos preguntado para el genoma humano: ¿qué hacemos con toda esta información? La respuesta a esta pregunta ahora es “metabolómica”.

Veamos los pasos que implican un estudio metabolómico (Lu et al., 2008): en principio hay que introducir la muestra dentro del equipo de UHPLC o HPLC, y esto requerirá de un procesamiento previo del fluido biológico que variará de acuerdo a lo que estemos estudiando; por ejemplo, no será lo mismo procesar orina que procesar una muestra de tejido de hígado. Una vez que la muestra sea analizada por el UHPLCMS obtendremos algo como lo representado en la figura 14.

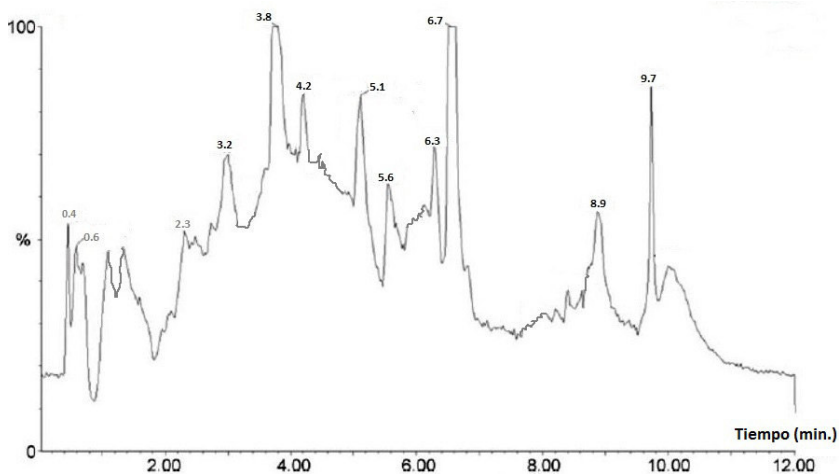


Figura N.º 14. Cromatograma de UHPLC-MS de una muestra biológica.

Fuente: elaboración propia.

En la figura 14 observamos un cromatograma, un gráfico donde se representa la corriente iónica en función del tiempo, donde cada pico registrado corresponde a un metabolito o más de un metabolito si la separación cromatográfica no fue eficiente. De esos picos se puede extraer el espectro de masa (o parte de este) de los metabolitos. Este tipo de gráfico representa lo que podríamos llamar “datos crudos”. Estos datos crudos deberán ser procesados para quitar ruidos de fondo, que son señales no pertenecientes a la muestra. Debido a su complejidad, esta tarea suele realizarse con la ayuda de *software*. Los estudios en metabolómica pueden ser dirigidos o no dirigidos (traducción directa del inglés, *targeted* y *untargeted*).

Cuando hablamos de los dirigidos, nos estamos refiriendo a que el investigador tiene información previa de cuáles son los metabolitos de interés en el ensayo. Quizá ya se disponga de suficiente información de trabajos anteriores como para enfocarse en los metabolitos claves de, por ejemplo, una patología determinada. Por lo tanto, solo centrará su

atención y todo el análisis en aquellos metabolitos de importancia ya reconocida o hipotetizada. Así, en una metabolómica dirigida se centra la atención hacia la identificación de los metabolitos de interés.

Por su parte, en un estudio metabolómico no dirigido, el investigador se encuentra frente a un escenario más indeterminado. Está frente a una cierta oscuridad en cuanto a lo que se sabe del tema a investigar. De hecho, es muy probable que esté realizando un experimento en busca de metabolitos nuevos o de metabolitos relacionados a cierta patología todavía no descriptos. Estos metabolitos pueden utilizarse, luego, para diagnosticar o seguir la evolución de una patología, por ejemplo. Entonces, en la metabolómica no dirigida, la determinación de la estructura de cada metabolito que generó una señal se realiza luego de haber analizado estadísticamente las señales.

Así, la identificación de cada metabolito va a depender de la información que tengamos y de cómo hayamos definido nuestro experimento antes de realizarlo (dirigido o no dirigido); esto no es menor, ya que la asignación de una estructura química a cada señal proveniente del espectro de masa puede ser una tarea ardua y, a veces, imposible. Para lograr dicha tarea, colaborarán tanto el *software* dedicado como las bases de datos; sin embargo, es quizá en la elucidación de una estructura química (colocarle el nombre al metabolito, decir qué compuesto ha dado origen a la señal registrada en el cromatograma) el momento en que se requiere de más trabajo y experiencia previa de los analistas (siendo a veces una tarea de alto costo debido al valor de los patrones marcados con isótopos estables como carbono-13 o deuterio). Aquí también puede recurrirse a la base de datos de metabolitos (HMDB) previamente citada, que contienen espectros realizados con distintas clases de equipos y condiciones. La informática está desarrollando *software*, intentando siempre mejorar este aspecto de la metabolómica: la elucidación de estructuras. En la figura 15 presentamos un esbozo de estos dos tipos de estudios metabolómicos.

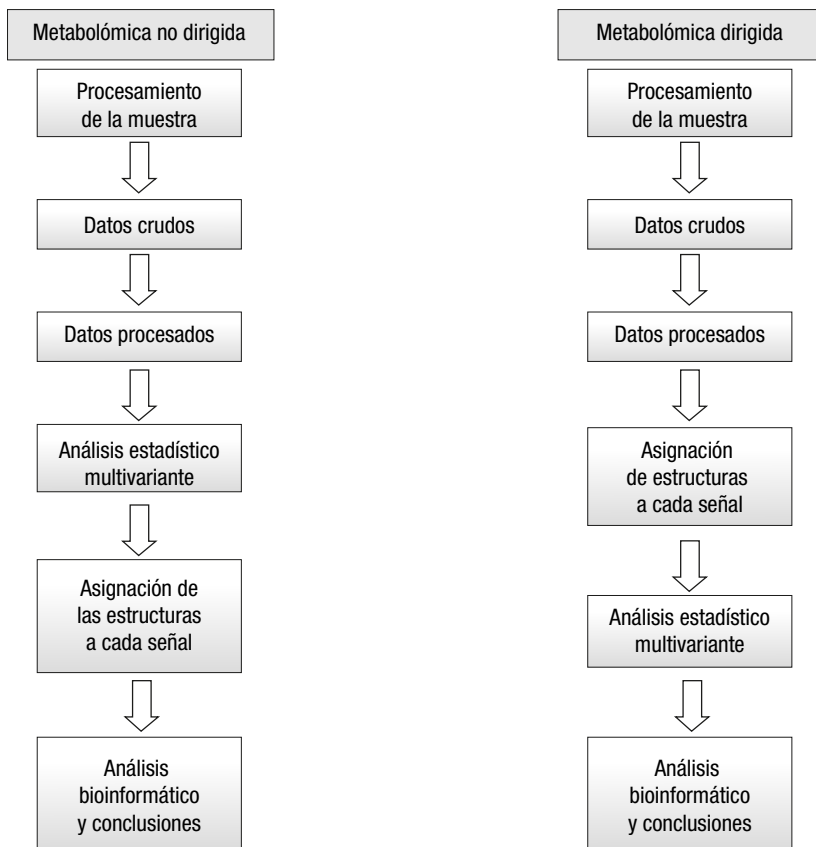


Figura N.º 15. Etapas metabolómica dirigida y no dirigida.

Fuente: elaboración propia.

Pensemos que un cromatograma de UHPLC-MS, como el mostrado en la figura 14, puede arrojar más de 150 señales por cada muestra. Esta es una cantidad de datos enorme. Los experimentos de bioquímica solían manejar muy pocas variables y ser extremadamente dirigidos a la detección de apenas una decena de metabolitos con mucha suerte. Volvemos a insistir con la revolución que implicó la aparición de las no-

vedosas fuentes de ionización de fines del siglo pasado. Lo que parecía una utopía, inyectar una muestra de plasma o de orina (incluso analizar una porción de tejido) en un espectrómetro de masa, se hizo realidad. Y también, como ocurrió con la genómica, trajo como resultado la obtención de muchísima información. Aquí debemos hacer una aclaración. Para poder comparar cómo cambian los valores de una variable entre dos grupos, es necesario realizar un test estadístico. Por ejemplo, podríamos tener un grupo de pacientes con hipertensión arterial y otro grupo de pacientes sin esa patología; de esta manera mediríamos a cada persona su nivel de colesterol, para poder explorar la hipótesis de que los pacientes con hipertensión arterial poseen mayores niveles de colesterol que aquellos pacientes que podemos considerar “normales” con respecto a la patología. Por supuesto que el concepto de “normal” es una quimera, y por eso el investigador debe fijar con anterioridad los criterios que va a adoptar para clasificar a cada individuo como “normal” o hipertenso.

Una vez que se mide el colesterol sanguíneo para cada individuo se comparan los valores de cada grupo. Básicamente podemos enfrentarnos solo a dos posibilidades:

1. que los niveles de colesterol sean iguales,
2. que los niveles de colesterol sean distintos.

Pero esta comparación no puede ser hecha “a ojo”, sencillamente mirando los datos y de acuerdo a cómo nos parezcan que son entre ellos. Es aquí cuando necesitamos de la ayuda de un test estadístico que nos diga, no solo si los valores son o no distintos, sino qué probabilidad tenemos de estar equivocándonos al llegar a una conclusión.

Los test estadísticos más habituales están preparados para manejar pocas variables, ya que al aumentar la cantidad de variables cada vez se torna menos creíble, es decir, pierde potencia. Ahora, con la EM, podemos tener hasta 500 señales (datos) para cada uno de los pacientes, ¿cómo los comparamos?, ¿cómo extraemos información de tamaña cantidad de metabolitos?, ¿cuáles han aumentado y cuáles han descendido? La estadística habitual no nos sirve. Debemos utilizar una estadística multivariante, preparada para manejar cantidades grandes de comparaciones, y que suele arrojar resultados gráficos de los cuales podemos extraer conclusiones.

Una de las herramientas estadísticas multivariantes más utilizadas en metabolómica es el análisis de componente principal (PCA – *Principal Component Analysis*), otras incluyen métodos conocidos como “supervisados”, por ejemplo, la regresión de cuadrados parciales mínimos (PLS – *Partial Least Square Regression*). La interpretación de estas técnicas es prácticamente gráfica y difiere mucho de la estadística clásica. Es una estadística descriptiva, que tiende a agrupar los datos y mostrar, por ejemplo, qué metabolitos pueden estar relacionados entre sí. Este tipo de estadística, nuevamente, cobra verdadero valor con el perfeccionamiento de las computadoras, a pesar de que sus bases ya habían sido propuestas por Carl Pearson a fines del siglo XIX. Además, suelen ser mucho más habituales en sociología y economía que en bioquímica; podríamos arriesgarnos a afirmar que recién con las nuevas fuentes de iones y el desarrollo de la espectroscopía de RMN se comenzaron a aplicar en la mencionada disciplina.

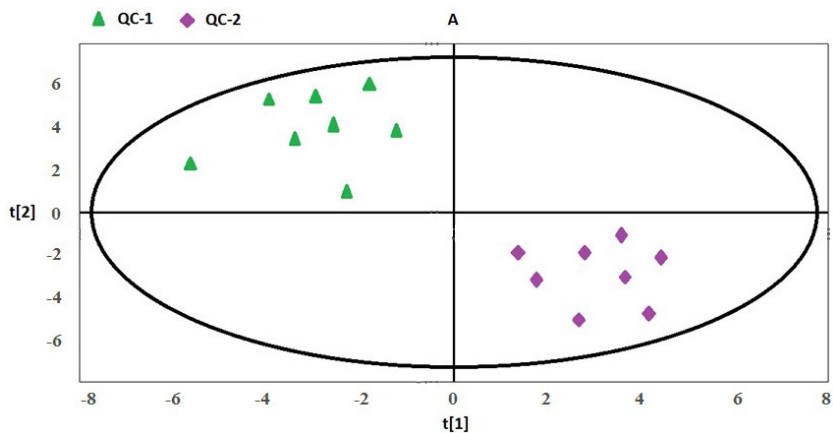


Figura N.º 16. Resultado de un análisis de componente principal (PCA) de 500 señales.

Fuente: elaboración propia.

En la figura 16 mostramos un ejemplo ilustrativo del tipo de resultados gráficos obtenidos con herramientas estadísticas multivariantes. En particular el gráfico muestra el resultado de una técnica estadística conocida como Análisis de Componente Principal (ACP o más habitualmente por sus siglas del inglés PCA). Por ejemplo, con esta técnica se lograron separar 500 señales registradas a partir de orina proveniente de dos grupos de 36 individuos cada uno, un grupo posee síndrome metabólico (SM) (describiremos este síndrome en el capítulo 5) y el otro no (Yu, Ning, Yu y Tang, 2014).

En el trabajo recién citado, luego de un arduo análisis estadístico, los autores propusieron nueve metabolitos como posibles marcadores del SM. Es decir que si en un individuo elegido al azar de la población encontráramos algunos de estos metabolitos aumentados en orina, podríamos sospechar sobre la presencia de este síndrome. Esto es un marcador de una enfermedad, y puede ser utilizado tanto como diag-

nóstico como para pronóstico y seguimiento de una patología. El hallazgo de determinados compuestos en fluidos corporales como plasma u orina ha sido siempre uno de los desafíos tanto de la bioquímica como de la medicina. Su hallazgo puede implicar, en el mejor de los casos, una nueva forma de determinar si una persona padece o no una patología. Incluso, ciertos marcadores pueden tener una función predictiva del desarrollo futuro de una enfermedad.

La metabolómica se ha convertido en una herramienta poderosísima para el hallazgo de nuevos biomarcadores de enfermedades. Así se han hallado, por ejemplo, biomarcadores para esquizofrenia en líquido cerebro espinal, marcadores de oclusión coronaria en muestras de plasma e, incluso, marcadores de infertilidad a partir de líquido seminal. Y la lista crece día a día (Nicholson y Lindon, 2008).

En farmacología es posible tomar muestras de un grupo de individuos o animales, a los que les hemos administrado una droga en particular. Contrastando siempre con otro grupo en el que sus participantes no hayan sido medicados, podremos comenzar a analizar cuáles son los metabolitos alterados por esa droga. Por ejemplo, administrando a ratas sustancias llamadas “nefrotoxinas” (es decir, sustancias que dañan el riñón) se han encontrado perfiles metabólicos distintos según la droga administrada (Lenz et al., 2005). Al conocer con más detalle cómo los fármacos actúan sobre nuestro metabolismo, podemos comprender uno de los aspectos más complicados de estos, que es su mecanismo de acción; es decir, cómo el fármaco logra su efecto: cuáles son los mecanismos bioquímicos por los cuales un compuesto logra, por ejemplo, disminuir el dolor. No se conocen los mecanismos de acción de todos los fármacos y, sobre todo, se desconoce la mayoría de sus efectos no deseados secundarios. La metabolómica es una nueva y poderosa herramienta para aportar conocimiento en este último campo perteneciente a la farmacología.

Hoy en día, una de las principales aplicaciones de la metabolómica se encuentra en el estudio de la flora intestinal. La microbiota intestinal está formada por más de 500 especies de organismos unicelulares que habitan de forma simbiótica nuestro intestino y participan del metabolismo de cualquier individuo sano. Su alteración puede acarrear diversos estados patológicos. La metabolómica puede comenzar a explorar la influencia de esta microbiota en el metabolismo, ya que estas bacterias suelen ser muy difíciles de estudiar fuera del organismo. Dos aspectos de un equipo de UHPLC-MS son claves para esto: una alta resolución cromatográfica que permite separar y reconocer un gran número de compuestos, junto a su enorme sensibilidad, que posibilita la detección de ciertos metabolitos que están en concentraciones indetectables por cualquier otro método. La metabolómica puede así, en principio, precisar cuáles de todos los metabolitos están vinculados a la flora intestinal y a qué bacteria específica. Asociada a estos estudios, se abre una nueva forma de proteómica, la metaproteómica, donde no solo se consideran las proteínas sintetizadas por nuestro organismo, sino también aquellas que provienen de la flora intestinal (Peters et al., 2019).

Ahora bien: podríamos preguntarnos, ¿por qué ciertos metabolitos varían su concentración en una patología?, ¿por qué puede variar de un individuo a otro? Recordemos lo que es el metabolito para ver con claridad que estos compuestos son sintetizados gracias a la presencia en nuestros organismos de enzimas. Estas enzimas (cuya descripción química exacta es “catalizador biológico”) hacen posibles las reacciones químicas que generan los miles de metabolitos de nuestro metaboloma. Son propias de la vida y solo pueden encontrarse en un ser vivo. Estas enzimas son proteínas, por lo tanto, la metabolómica está íntimamente relacionada con la proteómica.

En una cadena de reacciones biológicas, cuando una enzima se encuentra en baja concentración, todos los metabolitos anteriores

comienzan a acumularse, ya que no pueden transformarse químicamente en otros metabolitos. Esto quizá pueda comprenderse mejor con un ejemplo de cualquier proceso que ocurre en serie (un paso después del otro). Tomemos como ejemplo una fábrica de gaseosa, en donde una máquina carga de líquido el envase vacío; otra le pone la etiqueta, una tercera le coloca la fecha de vencimiento y la última le coloca la tapa. Obsérvese que cada evento solo puede ocurrir si sucedió el anterior. Además, si por ejemplo se avería la máquina que coloca la fecha de vencimiento y comienza a funcionar más lentamente, los envases vacíos y los envases con gaseosa sin tapar van a comenzar a acumularse, mientras que los envases cerrados no podrán generarse más. Lo mismo ocurre en términos bioquímicos: al tratarse de reacciones en serie, cada una suele ocurrir cuando la anterior fue llevada a cabo; cuando una enzima es defectuosa, más lenta o no está presente, los metabolitos anteriores a dicha reacción se acumulan, mientras que los que deberían formarse no se forman y disminuye su concentración. Esta es una manera de entender cómo la actividad enzimática maneja el metabolismo (el metabolismo podría ser pensado como una manifestación de las enzimas encargadas de las transformaciones químicas que ocurren en un ser vivo). De esta manera, damos un paso hacia adelante en complejidad: la metabolómica está íntimamente ligada a la proteómica y viceversa. Y si también recordamos que las proteínas son sintetizadas por los genes existentes en el núcleo celular, ya estamos dispuestos a aceptar que el vínculo entre metabolómica, proteómica y genómica es muy estrecho: uno explica al otro. Si comprender y estudiar cualquier ómica por separado representa un desafío intelectual e informático, entender a todas las ómicas interconectadas es una empresa monumental; uno de los mayores desafíos, sino el mayor, de las disciplinas ómicas.

En resumen, la irrupción de la EM (y de la espectroscopía de RMN; aunque en este texto no nos hemos abocado a ella, no debemos dejarla

de lado en estas consideraciones) en la ciencia del siglo XXI ha venido de la mano de nuevas disciplinas como la metabolómica y la proteómica. Las mencionadas disciplinas están revelando un nivel de complejidad quizás apenas sospechado en años anteriores acerca de lo que llamamos “vida”, y que aún sigue siendo una fuente de investigación que pareciera inagotable.

Un poco de historia de la espectrometría de masa

3.1. De los rayos catódicos a la fisión del uranio

Un recuento breve de la historia de la EM nos puede dar un ejemplo contundente de cómo la curiosidad científica enfocada en la búsqueda de respuestas a preguntas básicas sobre la naturaleza de la materia lleva, años después, al desarrollo de aplicaciones prácticas de gran relevancia para el diagnóstico médico, tales como las metodologías analíticas rápidas en microbiología clínica y la detección temprana de trastornos metabólicos en recién nacidos. Nunca está de más insistir en que, como en cualquier otra disciplina científica, cada nuevo avance en EM estuvo apoyado en los cimientos de todo el trabajo anterior, cada gran innovador pudo hacer su contribución gracias a los aportes previos de cientos de personas. En esta sección, reseñaremos entonces unos pocos grandes avances, particularmente los relacionados con las fuentes de ionización, analizadores y metodología analítica, sin ninguna pretensión de exhaustividad. Una historia completa de la EM puede encontrarse en una publicación de Michael Grayson (2002).

Hoy en día, la EM está asentada principalmente en diversas áreas de la química analítica, sin embargo, sus primeros pasos se dieron en las ciencias físicas. Su partida de nacimiento puede ubicarse en el laboratorio de Joseph John Thomson en la Universidad de Cambridge (Reino Unido). A fines de siglo XIX, este investigador estaba en la carrera por la determinación de la naturaleza de los rayos catódicos. Thomson que-

ría saber si los rayos catódicos eran ondas (como las ondas de sonido) o partículas, como podrían serlo, en otra escala, los granos de arena. Estos rayos catódicos, cuya naturaleza desvelaba a Thomson, son los mismos que permitieron el funcionamiento de los viejos televisores de tubo. Él creía en la teoría de partículas, por lo tanto, su objetivo era la medición de la masa de esas partículas desconocidas. Cuentan los historiadores que Thomson estaba muy bien entrenado en física teórica, pero era un poco torpe manualmente. Afortunadamente para él, y para la ciencia toda, su asistente de laboratorio Ebenezer Everett era muy habilidoso en la construcción del aparato que se necesitaba para la deflexión magnética de los rayos catódicos. Thomson usó el aparato construido por Everett para medir la relación e/m de estas partículas fundamentales -los electrones- en 1897 (los primeros físicos informaban la relación carga/masa, e/m ; en vez del estándar actual en EM, m/z). Por este trabajo de descubrimiento del electrón, Thomson recibió el Premio Nobel en Física en 1906.



Figura N.º 17. Retrato de J. J. Thomson.

Fuente: Wikimedia Commons.

Estos trabajos iniciales en rayos catódicos fueron el punto de partida de la EM. Luego de estos, en 1912 Thomson y su discípulo, Francis Aston (Premio Nobel en Química en 1922), construyeron un instrumento para medir las masas de átomos cargados, el que luego sería reconocido como el primer espectrómetro de masa, y consiguieron demostrar que el gas neón está constituido por dos isótopos de masa 20 y 22 en una relación de 10 a 1. Este espectrómetro de masa primitivo usaba tubos de descarga de gases para generar iones, estos pasaban luego por campos magnéticos y eléctricos paralelos, allí sufrían deflexión en trayectorias parabólicas y, finalmente, eran detectados mediante placas fotográficas. En las primeras tres décadas del siglo XX, Aston y otros científicos rediseñaron los instrumentos para mejorar la resolución –es decir, la capacidad del instrumento de separar y detectar dos iones de masas cercanas– y comenzaron a usarlos para separar y probar la existencia de isótopos de otros elementos. Este tipo de aplicaciones de la técnica, usada principalmente por físicos para resolver cuestiones sobre la naturaleza fundamental del átomo, fueron las dominantes hasta la década de 1940 (Griffiths, 2008).

“Masa para las masas” pareciera haber sido el lema de toda la vida activa de Alfred Nier, un ingeniero eléctrico de Minnesota, posteriormente doctorado en Física. Este fue quien mostró al mundo la practicidad de la EM, ayudando a su promoción en otras disciplinas por fuera de la estrecha comunidad de físicos a la cual pertenecía. Él diseñó y construyó varios instrumentos revolucionarios que permitieron, por ejemplo, reducir el consumo eléctrico del imán necesario para la deflexión y el análisis de los iones. Nier estaba incansablemente involucrado en hacer de la EM una disciplina que pudiera ser usada para muchas otras cosas por fuera de la física. Su generosidad con su tiempo y sus recursos era proverbial. Por ejemplo, ayudó a un grupo de biólogos en la preparación de compuestos enriquecidos con carbono-13 para estudios de

metabolismo, y asistió a geoquímicos en la determinación de la edad de la Tierra mediante la medición del cociente plomo-207/plomo-206 en la corteza terrestre. Por otra parte, contribuyó a los esfuerzos del enriquecimiento de uranio durante la Segunda Guerra Mundial al conseguir la separación por EM de nanogramos (1 nanogramo –ng– es la millonésima parte de 1 mg) de U-235 y U-238, lo que colaboró en la confirmación de que el primero era el isótopo responsable de la fisión lenta de neutrones (Griffiths, 2008).

3.2. De “ustedes no me necesitan” y polvo sobre un armatoste a los elefantes voladores

Entrando en la década de 1940, los espectrómetros de masa eran comerciales, y la técnica estaba firmemente establecida entre los físicos y los químicos de la industria, principalmente la petrolera. Estos químicos usaban la EM de manera cuantitativa en el control de procesos de producción; ellos ya conocían las identidades y estructuras de la mayoría de los compuestos en sus mezclas, usaban la EM solo para medir concentraciones. Pero en esa época nadie entendía realmente qué sucedía en el interior del instrumento, limitaban su utilidad a los análisis cuantitativos; información que no resultaba significativa para los químicos académicos. Peor aún, los espectrómetros de masa eran costosos, por lo que muchos departamentos de Química se resistían a invertir en una técnica cara y que parecía esotérica.

Sin embargo, los científicos estaban trabajando en el problema, y para 1954, año de la primera conferencia anual en EM en los Estados Unidos, la relación entre espectro de masa y estructura molecular ya era un tópico de investigación en laboratorios gubernamentales e industriales. Esto se vio reflejado en la publicación, por esos años, de trabajos significativos sobre este tema en la literatura científica y en conferencias como la mencionada. En esos años, el crecimiento sustantivo de la disciplina

se produjo por el liderazgo de tres químicos orgánicos en los Estados Unidos que ayudaron a cambiar la actitud negativa prevalente hacia la EM. Estos fueron Fred McLafferty (estadounidense), Klaus Biemann (austríaco) y Carl Djerassi (austríaco).



Figura N.º 18. Fred McLafferty, Carl Djerassi y Klaus Biemann (de izq. a der.).

Fuente: Fenselau (2015) (reproducida con permiso de John Wiley & Sons).

Mediante metódicos experimentos, estos científicos lentamente desentrañaron los mecanismos de fragmentación de diferentes clases de compuestos orgánicos, lo que permitió a los químicos emplear la EM como parte del proceso de determinación de las estructuras de compuestos desconocidos. El conjunto de trabajos de estos tres científicos llevó la técnica al día a día de la comunidad química, así como estableció

los basamentos para la moderna investigación en EM en el campo de la biología y las ciencias biomédicas.

De los tres, McLafferty se enfocó principalmente en instrumentación y metodología, interesándose en la relación entre espectro y estructura, más que en el uso de la técnica para la identificación de compuestos desconocidos. Él estableció las reglas y el lenguaje de la EM con compuestos de estructura conocida. Así, el *reordenamiento de McLafferty* es un ejemplo de este trabajo en mecanismos de fragmentación (este es una fragmentación que sufren diversos compuestos, por ejemplo, los ácidos grasos en una fuente de ionización electrónica, y que se sigue enseñando en cursos de química analítica instrumental).

Este científico desarrolló gran parte de su carrera en las universidades de Purdue y de Cornell, pero comenzó trabajando en la industria química, en The Dow Chemical Company. Cuenta que, en 1950, cuando le dijeron, en Dow, que su trabajo estaría dividido entre el laboratorio de química orgánica y el laboratorio de EM, les contestó que nunca había visto un espectrómetro de masa, que por lo tanto no lo necesitaban. Afortunadamente, el gerente de Dow fue paciente y la curiosidad de McLafferty sobrepasó por lejos a sus temores iniciales.

McLafferty es un personaje muy interesante, más allá de todos sus notables aportes a la ciencia. En 1943 se graduó en la Universidad de Nebraska y poco tiempo después ingresó al Ejército de los Estados Unidos. Combatió en la Segunda Guerra Mundial en Europa occidental durante la invasión a Alemania, y le fueron concedidas diversas condecoraciones por su actuación en el frente. Actualmente tiene 96 años, es profesor emérito de la Universidad de Cornell, y hasta hace muy poco seguía activo dirigiendo a un estudiante de doctorado: uno de sus nietos. En 1998 estuvo de visita en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad

de Buenos Aires para dar una charla sobre sus investigaciones en EM para la determinación estructural de proteínas. Esa charla tuvo lugar un miércoles, día habitual de las charlas científicas en el Departamento de Química Orgánica, a las 14. Lo curioso fue que una hora antes había estado almorzando en una parrilla cercana a Ciudad Universitaria, invitado por las autoridades del Departamento. Según cuentan testigos presenciales, McLafferty solo, por su cuenta, despachó una botella completa de buen vino tinto mendocino. Minutos después dictaba una conferencia brillante.

Biemann, por su parte, en 1956-1957 cursaba su posdoctorado en el Massachusetts Institute of Technology (MIT). Allí fue uno de los primeros en concebir que la EM podía emplearse para elucidar estructuras de productos naturales, a pesar de las prácticas corrientes de sus contemporáneos, contrarias a la introducción en un espectrómetro de masa de compuestos comparativamente grandes y polares tales como alcaloides (compuestos naturales que contienen nitrógeno en su estructura, como por ejemplo la nicotina) y derivados de aminoácidos y péptidos (estos últimos son cadenas cortas de aminoácidos).

Arthur Clay Cope, director del Departamento de Química del MIT de esa época, dudaba en comprar un espectrómetro de masa por los costos de inversión y de mantenimiento; el precio de esos instrumentos superaba ampliamente el de otros equipos comerciales que usaban los químicos de entonces. Biemann pudo finalmente convencer a Cope de comprar un instrumento de la empresa Consolidated Electrodynamics Corporation, empresa líder en el rubro por esos años. Cuenta Biemann que, luego de escuchar sus argumentos, Cope le dijo: “está bien, yo consigo los fondos para el instrumento, si usted promete que no juntará polvo” (citado en Griffiths, 2008): dos hombres de palabra. Con su nuevo instrumento, Biemann demostró que su intuición inicial era correcta; las estructuras de moléculas complejas podían ser determinadas con la ayuda de la EM.

En el proceso, también estableció las reglas de fragmentación de alcaloides y de péptidos; e incluso concibió un método para la secuenciación de péptidos por EM, el cual sentó las bases de la proteómica moderna.

Djerassi, a su vez, entró a la EM un poco más tarde que McLafferty y Biemann. Hacia 1960, Djerassi estaba firmemente establecido como un químico de productos naturales enfocado en terpenoides y esteroides.¹⁷ Ese año, invitó a Biemann a Stanford para que lo ayudara en el establecimiento de un laboratorio de EM; Biemann aceptó la invitación con total generosidad. Djerassi luego fue muy prolífico en la aplicación de la técnica en la resolución de problemas estructurales de esteroides y, en menor medida, de alcaloides. Sin dudas, el trabajo de estos tres investigadores ayudó a ampliar el abanico de aplicaciones de la técnica y a formar la generación siguiente de especialistas en EM. Biemann, por ejemplo, ha escrito sobre la Escuela de Espectrometría de Masa del MIT, donde se formaron al menos dos generaciones de investigadores en esta técnica (Biemann, 1994).

Por la década de 1980, los análisis por EM de moléculas orgánicas pequeñas eran rutina. Sin embargo, las proteínas y otras macromoléculas tales como ácidos nucleicos (fragmentos de ADN, por ejemplo) y carbohidratos complejos constituían todo un desafío (los carbohidratos son compuestos que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno, que incluyen los denominados “monosacáridos” como la glucosa, disacáridos como la mencionada sacarosa, y polisacáridos como el almidón). El problema era que, para las moléculas pequeñas, la ionización se basaba en coli-

17 Un poco de cultura química: los terpenoides son compuestos de estructura muy diversa que se encuentran en aceites esenciales provenientes de material vegetal, como por ejemplo la cáscara de limón. Por su parte, dentro de la amplia familia de los esteroides encontramos compuestos como el mediático colesterol y otros un poco menos renombrados, tales como la testosterona, el estradiol y la progesterona.

siones en fase gaseosa entre la molécula y una partícula cargada; no se había todavía ideado cómo llevar moléculas grandes a fase gaseosa sin que estas se fragmentaran y se descompusieran. Un gran número de técnicas habían sido ensayadas, pero ninguna funcionaba del todo bien. Hasta que, en 1988, los métodos de ionización ESI y MALDI hicieron su entrada triunfal en el escenario de la EM casi simultáneamente. Estas técnicas de ionización revolucionaron la EM al permitir que la precisión, sensibilidad y elegancia de la técnica estuvieran disponibles para el estudio de biomoléculas y sus reacciones. Aún hoy son las formas dominantes de ionización de macromoléculas; bien puede afirmarse que estas técnicas de ionización, en palabras de John Fenn, les dieron alas a los elefantes moleculares.

Fenn realizó los trabajos de desarrollo de ESI en la Universidad de Yale. Él siempre reconoció la importancia de los trabajos pioneros de Malcom Dole, quien, en 1968, había demostrado que, disolviendo sustancias no volátiles en solventes volátiles y produciendo gotas altamente cargadas de estas soluciones, la evaporación del solvente dejaba iones intactos del soluto en fase gaseosa. Este trabajo fue la semilla que, luego de un largo período de germinación, finalmente fructificó en el artículo fundacional publicado en la revista *Science* en 1989 (Fenn, Mann, Meng, Wong y Whitehouse, 1989) y en el posterior desarrollo comercial de miles de instrumentos provistos de una fuente de ionización ESI (uno de estos instrumentos se encuentra actualmente en el Laboratorio N° 1 del CEMET, lo cual contribuye al desarrollo de nuestras tareas de investigación).

Antes de llegar a este éxito pasaron cosas. En 1982, Masamichi Yamashita (japonés) se unió al grupo de Fenn como alumno del posdoctorado y en poco tiempo ensambló lo que fue realmente el primer espectrómetro de masa con fuente ESI a partir de piezas sueltas de un primitivo aparato de haz molecular, aparato que Fenn se resistía a tirar

a la basura –según él mismo por su ascendencia escocesa: “no tires lo que no quieres” (Fenn, 2003: p. 3888)–. Este aparato incluía un viejo cuadrupolo cuyo límite superior de m/z era de solo 450. Con ese instrumento obtuvieron espectros de distintos componentes de una tableta de vitamina B, tales como las vitaminas B1 y B6, sustancias termosensibles que no pueden estudiarse mediante los métodos de ionización más comunes. Posteriormente, el grupo de Fenn consiguió el préstamo de un cuadrupolo usado que podía medir iones de m/z hasta 1.500 por parte de la empresa británica VG Analytics.¹⁸ Este cuadrupolo fue incorporado en un nuevo sistema diseñado y ensamblado por Craig Whitehouse. Con este nuevo instrumento pudieron analizar péptidos cíclicos como la ciclosporina A y la gramicidina S, y de ahí al análisis de péptidos naturales y proteínas fue un abrir y cerrar de ojos.

Con estos últimos compuestos, hacia fines de 1987, ya habían conseguido resultados promisorios. La interpretación de los espectros de las proteínas que analizaron, por ejemplo, el citocromo C, se dificultaba por la presencia de picos múltiplemente cargados para la misma especie. Esta dificultad fue resuelta en poco tiempo por otro alumno de doctorado de Fenn, Matthias Mann (alemán), quien desarrolló un algoritmo con el cual podía calcularse fácilmente la masa molecular de la proteína. Estos resultados fueron presentados por primera vez en la trigésimo sexta Conferencia en Espectrometría de Masa y Tópicos Relacionados de la American Association for Mass Spectrometry (ASMS) en junio de 1988, en San Francisco, frente a una audiencia escasa y poco participativa. Sin embargo, cuando estos resultados fueron publicados en 1989 desataron una catarata de publicaciones en el tema y dispararon lo que se ha llamado con toda propiedad “la revolución del electrospray”.

18 Que luego se transformaría en Micromass Ltd. para finalmente ser absorbida por Waters.

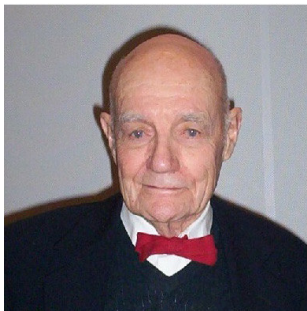


Figura N.º 19. John Fenn.
Fuente: Wikimedia.



Figura N.º 20. Franz Hillenkamp (izq.) y Michael Karas (der.).
Fuente: reproducida con permiso de Griffiths, J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 80 (15), pp. 5678-5683. Copyright (2008) American Chemical Society.

Por la misma época, Franz Hillenkamp y Michael Karas (alemanes), primero en la Universidad de Frankfurt y luego en la de Münster, estaban desarrollando una técnica muy diferente para resolver el mismo problema de ionizar proteínas. La técnica MALDI nació de la experiencia de Hillenkamp con un analizador de masa con microsonda láser. El grupo de investigación de Hillenkamp estaba intentando mapear la distribución espacial de iones calcio en células de músculo cardíaco mediante esa microsonda, pero las señales del fondo dificultaban la interpretación de los espectros. Hillenkamp cuenta que ese fondo parecía tener cierto tipo de patrón general y él supuso que deberían ser fragmentos iónicos de la matriz orgánica. Entonces cambiaron la matriz orgánica y observaron un cambio en el patrón general. Esa observación le disparó la idea de que quizás se podrían generar iones de moléculas orgánicas con la microsonda láser (Griffiths, 2008). Cuando Karas se unió al grupo de Hillenkamp comenzaron a desarrollar un estudio sistemático de la desorción láser de moléculas orgánicas pequeñas.

La observación clave provino del estudio de una mezcla de dos aminoácidos -triptofano y alanina-, cuando descubrieron que a un valor de

energía del láser suficiente para generar iones de triptofano también se obtenía una señal para alanina, la cual cuando era observada en solitario necesitaba mucha más energía del láser. En palabras de Hillenkamp, el triptofano estaba llevando a cuestas a la alanina; dicho de otra manera, de algún modo el aminoácido triptofano facilitaba la ionización del aminoácido alanina. Estos datos fueron inspiradores, y de allí en más fue todo trabajo duro hasta encontrar una matriz orgánica apropiada que hiciera volar las proteínas.

Finalmente, Karas y Hillenkamp publicaron sus descubrimientos (Karas, Bachmann y Hillenkamp, 1985; Karas y Hillenkamp, 1988) y acuñaron el nombre “MALDI”. Sin duda alguna, MALDI y ESI consiguieron abrir la EM a todo un nuevo grupo de investigadores de diversas disciplinas de la biología, haciendo que la técnica fuera mucho más accesible para el usuario estándar no especialista en EM. Estos dos métodos, que siguen siendo los métodos de elección para ionizar péptidos y proteínas, son competitivos y complementarios. Muchos problemas analíticos pueden resolverse con cualquiera de ellos. Pero cada uno tiene sus fortalezas y debilidades. Por ejemplo, es mucho más fácil acoplar ESI con técnicas de separación cromatográficas como la cromatografía de líquidos. Por otro lado, MALDI es mucho más tolerante a contaminantes tales como las sales o los detergentes.

Un poco más de una década después de los primeros vuelos proteicos, hacia el 2000, como bien cuentan Hillenkamp y Karas (2000), MALDI ya era todo un éxito; había llegado a su madurez plena. De ser una técnica que se discutía en sesiones poco numerosas fuera de los horarios centrales de los congresos científicos, se había transformado en uno de los centros de atracción y discusión en prácticamente todas las conferencias en EM de la época, y crecientemente también en los simposios de bioanalítica. Más aún, miles de instrumentos con MALDI como método de ionización podían encontrarse en laboratorios aca-

démicos e industriales, y muchos científicos contaban con esta técnica para el desarrollo de sus diversos proyectos individuales.

Al presente, las aplicaciones de MALDI se han extendido hacia territorios impensados pocos años atrás, en particular hacia la arena de la biomedicina. Presentaremos estas aplicaciones con cierto detalle más adelante, pero ahora podemos mencionar un par de ejemplos. Los laboratorios de análisis clínicos están usando MALDI para identificar bacterias mediante espectros de masa que muestran proteínas, fosfolípidos y lipopéptidos cíclicos representativos de cada especie bacteriana. Otra aplicación biomédica innovadora y en pleno desarrollo de MALDI se encuentra en el registro de imágenes por EM (Imaging Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés, IMS). Mediante esta metodología se puede investigar el contenido y la distribución de moléculas endógenas y exógenas directamente de cortes de tejido; por ejemplo, es factible el mapeo de la evolución de los perfiles de numerosos biomarcadores potenciales incluyendo proteínas, péptidos y lípidos, mientras se mantiene una alta correlación entre las imágenes moleculares y los análisis histológicos (Thomas et al., 2013).

Curiosamente, los inventores del método MALDI, Franz Hillenkamp y Michael Karas, no fueron galardonados con el Premio Nobel en Química, como si lo fue John Fenn, el otro artífice de la revolución biológica en la EM. En 2002, una mitad del Premio Nobel en Química fue asignada y distribuida por partes iguales a John Fenn y Koichi Tanaka (japonés). Claramente Fenn fue premiado por su trabajo en ESI; y Tanaka reconocido por su método de ionización de proteínas por desorción láser. Tanaka fue el primero en mostrar que las proteínas grandes podían ser ionizadas, analizadas y detectadas usando desorción láser. Sin embargo, el método de Tanaka tiene algunas diferencias sustantivas con MALDI. A pesar de que ambos métodos usan un láser para la ionización, en MALDI una matriz orgánica, usualmente un compuesto

aromático (esta familia de compuestos incluye entre sus miembros más notorios al benceno y al tolueno), absorbe la energía del láser y transfiere parte de esta al analito. En cambio, el método de Tanaka emplea una suspensión de nanopartículas metálicas en glicerol para este propósito. En MALDI, el analito se mezcla con la matriz y está sumergido en esta; en el método de Tanaka, el analito se asienta en la superficie de las nanopartículas. Por muchas razones, incluyendo su mayor sensibilidad comparada con la del método de Tanaka, MALDI fue el método que la comunidad de EM adoptó masivamente. Entonces, ¿por qué el comité del Nobel no reconoció a Hillenkamp y Karas si, como se mencionó, al inicio del siglo XXI, MALDI era el método abrumadoramente victorioso?, ¿por publicar su método muy poco después de la publicación del método de Tanaka? No parece muy justo. La realidad es que las técnicas descritas y desarrolladas por Karas y Hillenkamp son las que todo el mundo usa hoy en día, y no las de Tanaka. Sin dudas, se concuerda con Matthias Mann en que es importante que la comunidad de investigadores y usuarios de la EM reconozca la relevancia y trascendencia del trabajo en MALDI, a pesar de la clamorosa omisión del comité Nobel (Griffiths, 2008).

3.3. Siglo XXI, el señor de los anillos habita en el Planeta Orbitrap

Planeta Orbitrap es el sitio web de la empresa Thermo Fisher Scientific donde se puede encontrar literatura y aplicaciones sobre los espectrómetros de masa basados en el analizador Orbitrap. Este analizador, el primero y hasta ahora único analizador del siglo XXI, fue bautizado Orbitrap por su creador, el “señor de los anillos” Alexander Makarov (ruso). Desde 2005, año de la salida al mercado del primer instrumento basado en Orbitrap, al presente, se ha desarrollado una variedad de instrumentos basados en este analizador para un amplio abanico de aplicaciones. Estas incluyen análisis de rutina y de cuantificación como

también desafíos analíticos complejos que van de la proteómica a la identificación y caracterización estructural. Los orígenes del analizador Orbitrap pueden ubicarse en el principio de la trampa orbital introducida en 1923 por Kingdon. El desarrollo del primer analizador de masa Orbitrap estuvo empujado por la necesidad de construir un espectrómetro novedoso que superara las limitaciones de instrumentos previos. Entre las limitaciones, podemos mencionar la complejidad, el tamaño y el alto costo de inversión y mantenimiento de los analizadores de resonancia de ion ciclotrón por transformada de Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, por su sigla en inglés: FT-ICR), la baja sensibilidad, el bajo rango dinámico¹⁹ y, en esa época, la baja resolución de los analizadores de tiempo de vuelo; además de la limitada exactitud de masa de los analizadores de trampa de iones.

Como se mencionó, cuando los iones ingresan al Orbitrap experimentan un campo eléctrico no estático cuyo incremento los comprime hacia el electrodo central, y allí realizan una oscilación axial de trayectoria en forma de espiral donde los paquetes de iones de cada valor de m/z se extienden sobre la coordenada angular, formando en consecuencia anillos rotantes. Llegamos así a 2005, cuando la empresa Thermo Electron (actualmente Thermo Fisher) introduce el espectrómetro de masa LTQ Orbitrap, el primer instrumento comercial en incorporar un analizador de masa Orbitrap, cuyo diseño original incorporaba una trampa de iones lineal seguida del analizador Orbitrap (Eliuk y Makarov, 2015). Con este instrumento podían registrarse espectros de masa simples (EM) y en tándem (EM/EM) utilizando el Orbitrap para máxima resolución y exactitud de masa, o la trampa de iones para mayor sensibilidad y velocidad.

19 El rango dinámico es el rango de concentraciones en el cual la presencia de un analito genera una respuesta medible por un instrumento.

Desde 2005 al presente los avances en el desarrollo de la tecnología Orbitrap han continuado incesantemente, motivados por las necesidades y los deseos de la amplia comunidad de profesionales y científicos que diariamente practican el arte de la EM para resolver problemas analíticos o realizar nuevos descubrimientos científicos. Por todo esto, Makarov y su grupo de trabajo están convencidos de que el horizonte para el desarrollo de futuras aplicaciones de la tecnología Orbitrap es amplio y está en expansión.

3.4. ¿Fin de la historia?

En suma, toda esta rica historia, que incluye los aportes de innumerables investigadores (algunos de los cuales están mencionados brevemente en la tabla 1) y, por supuesto, la copiosa producción del propio Fred McLafferty a lo largo de su extensa carrera, sumada al vigoroso desarrollo actual de la disciplina, demuestran que las dotes predictivas de McLafferty eran totalmente opuestas a su capacidad como investigador y docente. En 1956, cuando estaba considerando abandonar la investigación en EM, uno de sus amigos le preguntó: “¿Y? ¿Qué tal la espectrometría de masa?”, a lo que McLafferty contestó: “Bueno, me parece que ya se desarrolló hasta donde podía llegar” (Griffiths, 2008: p. 5681). Por el contrario, pareciera ser que a la EM le cabe una adaptación del eslogan que recordaba Fenn en su Conferencia Nobel: “las tareas difíciles se pueden completar rápidamente; las imposibles demoran un poco más” (Fenn, 2003: p. 3893).

Tabla 1. Otros avances importantes en instrumentación en EM del siglo XX

Qué	Quién	Cuándo
Primera fuente de impacto electrónico (sólidos)	Arthur Dempster	1918
Primera fuente de impacto electrónico (gases)	Walker Bleakney	1929
Analizador de tiempo de vuelo (TOF)	William Stephens	1946
Analizador de cuadrupolo y trampa de iones cuadrupolar	Wolfgang Paul	1953
Ionización química	Frank Field	1966
Analizador de masa de triple cuadrupolo	Richard Yost y Christie Enke	1978

Fuente: elaboración propia.

La espectrometría de masa en el ámbito de la biología y la salud

Las aplicaciones de la EM en el mundo de la biología y la bioquímica clínica florecieron en la década de 1980 del siglo pasado. Sin embargo, sus inicios pueden establecerse unos 40 años antes con el uso del carbono-13 como trazador para estudiar procesos de producción de dióxido de carbono en animales. Desde esos tiempos, los avances tecnológicos aumentaron el rango de sustancias que podían ser ionizadas y el rango de masas medibles, lo cual diversificó, por lo tanto, las aplicaciones de la EM en la biología y la salud humana. Como ya relatamos, en 1956 pudieron estudiarse compuestos orgánicos por primera vez, y de 1959 datan los primeros experimentos de secuenciación de péptidos y oligonucleótidos por EM. Gracias a las mencionadas investigaciones del grupo de John Fenn, la estructura de las proteínas pudo estudiarse por EM por primera vez en 1990, y la técnica de reconocimiento de la “huella digital” de la masa de péptidos usada para identificar proteínas por EM se desarrolló en 1993. Poco tiempo después, la capacidad para identificar proteínas se incrementó aún más gracias al desarrollo de programas informáticos de búsqueda de espectros de masa de proteínas en bases de datos de secuencias de aminoácidos disponibles en la red. Y en 1999 se desarrollaron las técnicas de cuantificación de proteínas individuales en mezclas complejas.

En estos días, la EM se ha convertido en una herramienta vital para la investigación en proteómica, ya que provee información sobre la iden-

tividad de una proteína, la cantidad de la proteína presente, y las modificaciones estructurales que ella puede contener. Actualmente, las aplicaciones de la EM en biología y salud humana abarcan campos muy diversos tales como la detección de trastornos metabólicos en neonatos, la comparación de niveles de expresión de proteínas entre células crecidas en diferentes medios, la determinación de la biodisponibilidad de minerales en alimentos, el estudio del metabolismo de fármacos *in vivo*, etcétera (Finehout y Lee, 2004).

En el ámbito particular de las aplicaciones de la EM en el laboratorio clínico, podemos observar una rápida transición desde los iniciales ensayos especializados hacia modernas aplicaciones muy amplias de esta técnica. Así, llegamos a la conclusión de que la EM ha contribuido a mejorar de manera significativa la atención de los pacientes de una manera rentable. Históricamente, los impactos principales de la EM en la bioquímica clínica fueron la confirmación de análisis de inmunoensayos positivos en el rastreo de drogas hacia 1988, el establecimiento de la identificación de errores congénitos en el metabolismo de neonatos hacia 1990 y el análisis de hormonas esteroidales, tales como la testosterona, hacia 1996 (Jannetto y Fitzgerald, 2016). En 1996 también se publicó el primer trabajo sobre la identificación rápida de bacterias basada en los espectros de masa obtenidos mediante MALDI-TOF (Holland et al., 1996). Un breve resumen de la evolución de la EM en el laboratorio clínico puede observarse en la figura 21.

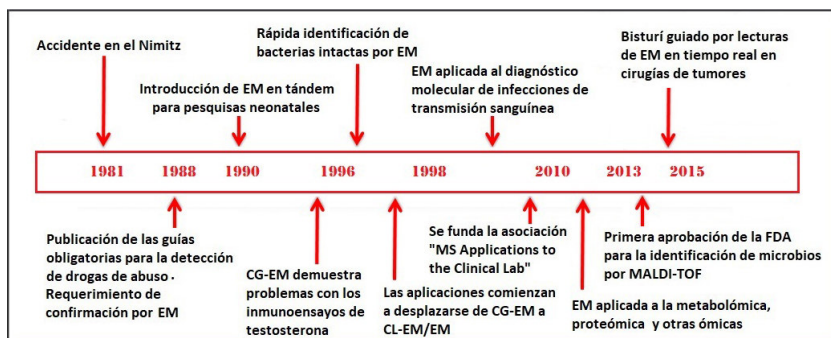


Figura N.º 21. Historia de las aplicaciones biomédicas de la espectrometría de masa.

Fuente: elaboración propia.

La evolución de la EM en biomedicina ha estado dirigida por las continuas mejoras en las plataformas analíticas, y sostenida en la especificidad analítica de la tecnología. Es así como la identificación definitiva de moléculas en el rango de tamaños que va de decenas de unidades de masa atómica (moléculas pequeñas) a cientos de miles de unidades de masa atómica (macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos) está fundamentada en principios diferentes. Por ejemplo, las moléculas pequeñas son habitualmente identificadas usando CL-EM/EM. Las identificaciones por esta técnica implican el uso de un conjunto de parámetros analíticos tales como el tiempo de retención de los analitos, la selección de iones precursores adecuados y los cocientes de iones fragmentos.

En el caso particular de los análisis de neonatos, las muestras son inyectadas directamente en el espectrómetro de masa sin pasar por un sistema de cromatografía y las identificaciones se basan en transiciones específicas de ion precursor a ion producto. En los laboratorios de microbiología, las identificaciones surgen de los patrones de iones generados por ablación láser sobre las proteínas bacterianas. En todos los

casos, la especificidad analítica del ensayo depende de la capacidad del espectrómetro de masa de, como dijimos antes, “pesar en la escala molecular” determinando el cociente masa/carga (m/z) de los iones de interés.

Podríamos afirmar que fue un accidente militar el que ayudó a realizar la transición de la EM desde el laboratorio de investigación hacia el laboratorio clínico. En efecto, en mayo de 1981, una aeronave se estrelló al aterrizar en el portaviones Nimitz de la Armada de los Estados Unidos de Norteamérica, mató a 14 personas e hirió a otras 45. Los inmunoensayos subsecuentes resultaron en un gran porcentaje de positivos para metabolitos de marihuana en las muestras de orina del personal del portaviones. Esto motivó al presidente Ronald Reagan a imponer una política de tolerancia cero para las drogas de abuso en las fuerzas armadas de su país. Debido al gran número de resultados falsos positivos de los inmunoensayos, de uso corriente en esos años, estos comenzaron a ser considerados presuntos hasta ser confirmados por GC-MS. Pronto se demostró que los ensayos de rastreo de drogas de abuso por GC-MS eran efectivos en reducir el número de casos positivos, ya que estos se contrajeron de 18% a 8% en un período de 10 años. Por otra parte, otros estudios indicaron que este tipo de análisis por GC-MS también eran rentables (Peat, 1995). Y así fue como el requerimiento de la confirmación por GC-MS condujo al desarrollo de la EM en los laboratorios de toxicología; allí la técnica posteriormente se extendió al monitoreo de compuestos terapéuticos.

Los equipos de GC-MS de uso corriente en los laboratorios bioquímicos son instrumentos donde la fuente de ionización es una fuente de ionización electrónica y los analizadores son cuadrupolos o triple cuadrupolos. Sin embargo, los instrumentos de EM de relación isotópica (EMRI, o IRMS por su sigla en inglés) también han demostrado su utilidad tanto en el diagnóstico clínico como en investigaciones bioquí-

micas y en estudios de autenticidad de alimentos. Esta es una técnica que mide la abundancia isotópica relativa de los elementos mediante instrumentos usualmente conformados de la siguiente manera:

1. Cromatógrafo de gases, por donde se introduce la muestra.
2. Cámara de combustión, que transforma las sustancias orgánicas en el gas dióxido de carbono.
3. Fuente de ionización electrónica, donde el gas es ionizado.
4. Campo magnético que separa los iones.
5. Copas de Faraday donde ocurre la detección.

Recordemos que el carbono tiene dos isótopos estables: carbono-12 y carbono-13, por ende, un equipo de EMRI permite la determinación del cociente carbono-13/carbono-12. Este cociente puede ser medido, por ejemplo, en una muestra de tejido o en un ácido graso específico dentro del tejido. En el caso de alimentos, la medición de este cociente en miel y en jugo de manzana, puede revelar si estos alimentos han sido adulterados con jarabe de maíz. Un ejemplo muy interesante en el mundo clínico es el uso de esta técnica como herramienta para el diagnóstico de enfermedades. En efecto, en 2003 se publicó un trabajo que demostraba que el análisis del aliento mediante EMRI permitía el diagnóstico de infecciones con la bacteria *Helicobacter pylori* en niños (Canete et al., 2003).

Hacia los 90, la evidencia de la limitación de los inmunoensayos fue extendiéndose desde los análisis toxicológicos hacia los análisis de hormonas esteroides, especialmente cuando era necesario medir bajas concentraciones de testosterona en mujeres y niños. Estas limitaciones y

la creciente familiarización de los laboratorios clínicos con la GC-MS allanaron el camino para el uso de técnicas de GC-MS en la cuantificación de testosterona y otras hormonas esteroideas.

Sin embargo, una limitación primaria de la GC-MS es que los analitos deben ser volátiles y, por lo tanto, muchos ensayos clínicos necesitan de diversas etapas de extracción y purificación, más una etapa adicional llamada “derivatización química” en la que los analitos se transforman en especies con la volatilidad adecuada para los análisis subsiguientes. Estos amplios esquemas de preparación de muestras requeridos para los análisis por GC-MS limitaron la aplicación generalizada de la EM en el laboratorio clínico dado el bajo rendimiento y alto costo que estos protocolos implican. Más adelante en el tiempo, las técnicas de ionización a presión atmosférica, tal como la ya descrita ESI, como interfase entre la CL y la EM/EM, fueron el siguiente avance que permitió que la EM se transformara en una plataforma viable para aplicaciones de rutina en los laboratorios clínicos. Efectivamente, las técnicas de ESI CL-EM/EM eliminaron la necesidad de transformar los analitos en especies volátiles y, por ende, ayudaron a simplificar los esquemas de preparación de muestras. Estos esquemas simplificados significaron mejoras en la productividad y menores costos. Por ejemplo, para los ensayos por GC-MS un técnico demora ocho horas en preparar 50 muestras, en cambio, esas mismas 50 muestras se pueden preparar en menos de dos horas para los análisis por CL-EM/EM. Esta simplificación de los protocolos de preparación de muestras ha posibilitado que la EM se haya convertido en una herramienta analítica rentable en el laboratorio clínico (Jannetto y Fitzgerald, 2016).

Esta técnica de CL-EM/EM es particularmente significativa en la caracterización de acilcarnitinas en sangre. Estos son compuestos que pueden ser usados para rastrear desórdenes hereditarios en neonatos en el proceso metabólico de oxidación de ácidos grasos. En este caso, la

EM es usada para medir el largo de la cadena de las acilcarnitinas (en otras palabras, el tamaño de esas moléculas) y la abundancia de estas en sangre. Comparando los espectros de masa resultantes con aquellos de un infante normal, los médicos pueden diagnosticar si está presente un desorden en la oxidación de ácidos grasos y, en algunos casos, pueden incluso determinar la enzima exacta responsable de la deficiencia (Chace, Kalas y Naylor, 2002).²⁰

En el caso particular de los laboratorios de microbiología, el desarrollo de la ionización MALDI combinada con los analizadores TOF permitió los análisis rápidos de identificación de microorganismos. Antes de la implementación de MALDI-TOF, los laboratorios de microbiología dependían de la tinción de Gram, cultivos, ensayos bioquímicos y ensayos de susceptibilidad. Los ensayos que usan MALDI-TOF, aprobados por la Food and Drug Administration (FDA, en español: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), han reducido el tiempo promedio de identificación de microorganismos en 1,45 días comparados con las técnicas convencionales (Tan et al., 2012). Estos autores informaron sobre los ahorros en el laboratorio que estas nuevas metodologías implican, pero no comentaron sobre los ahorros del sistema de salud asociados a una rápida identificación de patógenos, los que probablemente también lleguen a ser sustanciales. Por otro lado, y más importante, la identificación rápida de una bacteria patogénica puede ser la diferencia entre la vida y la muerte en condiciones extremas.

Al presente, la comercialización de instrumentos de MALDI-TOF para microbiología clínica es una realidad, al punto de que existen

²⁰ Como ya se ha mencionado, una enzima es una proteína que funciona como catalizador de una determinada reacción bioquímica; es decir, una especie química que permite que la reacción en cuestión ocurra más rápida y selectivamente.

sistemas consistentes en el instrumento de EM en sí, *software* y bases de datos de microorganismos, de diversas marcas comerciales, aprobados por la FDA. La lista de organismos aprobados por la FDA no es exhaustiva y comprende principalmente bacterias gram-negativas y gram-positivas y levaduras; sin embargo, también están disponibles bases de datos más amplias para empleo exclusivo en investigación. Los usuarios de esta tecnología pueden construir sus propias bases de datos de espectros de masa usando cepas relevantes aisladas localmente y luego ser rastreadas junto a las bases de datos comerciales. Como ejemplo de esto, podemos mencionar que la Clínica Mayo ubicada en Rochester (Minnesota, Estados Unidos) ha construido una biblioteca de espectros MALDI-TOF propia, que contiene 1.599 espectros de masa que no están presentes en las bases de datos disponibles comercialmente (Patel, 2015). Además de MALDI-TOF, se han desarrollado otras plataformas basadas en EM para la rápida identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas. Estas plataformas emplean ESI para identificar productos amplificados por PCR con cebadores genéricos. A pesar de que todavía no está aprobada por la FDA, esta aproximación combina especificidad molecular con un tiempo de solo ocho horas para la identificación definitiva del patógeno (Ecker et al., 2010).

Otras aplicaciones recientes de la técnica de EM MALDI comprenden la obtención de imágenes de relevancia clínica. En la práctica e investigación en patología, las imágenes obtenidas por MALDI han sido usadas para identificar proteínas, péptidos, fármacos y sus metabolitos, lípidos y otros analitos en tejidos. Específicamente, las imágenes MALDI han permitido mediciones múltiples, libres de marcadores, de una amplia variedad de compuestos en secciones de tejidos, preservando al mismo tiempo la muestra para tinciones histológicas convencionales. Como ejemplos, podemos mencionar el mapeo mediante MALDI de proteínas específicas en tejido cerebral y carcinoma mamario, como así

también la obtención de imágenes a partir de la detección de formas truncadas de la proteína β -amiloide en las placas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Seely y Caprioli, 2008).

Las técnicas de imágenes por EM MALDI han sido también aplicadas a biopsias humanas en colaboración con patólogos en estudios que apuntan a desarrollar mejores diagnósticos y mejores evaluaciones de la eficacia de los tratamientos terapéuticos, aspectos vitales en la creciente área de la medicina personalizada (McLafferty, 2008). La aproximación combinada (imágenes MALDI con la histología convencional) mantiene la localización espacial de los espectros de masa resueltos y, al mismo tiempo, el *software* puede ser usado para brindar una microdissección virtual del tejido mientras se visualizan compuestos individuales o grupos de compuestos. Los estudios de imágenes MALDI abarcan los distintos tipos de tejidos de uso corriente en patología: tejidos frescos congelados, tejidos embebidos en parafina y tejidos fijados con formalina (Jannetto y Fitzgerald, 2016).

Quisiéramos mencionar también otros dos desarrollos de áreas de investigación en EM clínica que están muy cerca de trasladarse al día a día del mundo hospitalario. Uno de ellos es el bisturí electroquirúrgico, una especie de sonda de electrospray, el cual, buscando marcadores metabólicos de cáncer, testea metabolitos evaporados directamente de tejidos, ayudando así al cirujano a decidir durante la operación si la remoción de un tumor ha sido completa o no (Balog et al., 2010). La segunda es la medición de metabolitos orgánicos volátiles, indicadores de patologías, en el aliento exhalado, como una nueva oportunidad para la determinación del perfil metabólico con la mira en el diagnóstico temprano. Como ejemplo de esto, se ha publicado un trabajo que analiza el aliento de pacientes que sufren de hipertensión pulmonar arterial como herramienta de detección y clasificación de esta enfermedad (Cohen-Kaminsky et al., 2013).

La espectrometría de masa como herramienta de investigación en los proyectos en desarrollo en el Instituto de Ciencias de la Salud de la UNAJ

Nuestro grupo de investigación se encuentra trabajando actualmente en un proyecto marco, financiado parcialmente por la UNAJ, denominado “Aplicaciones biomédicas de la espectrometría de masa”, que comprende tres subproyectos (a estos se ha sumado recientemente la posibilidad de un cuarto), y en otro proyecto relacionado a la metabólica del SM. Todos ellos lógicamente basados en la herramienta analítica de la EM. En este sentido, el Laboratorio N° 1 del CEMET, lugar donde desarrollamos nuestras tareas, cuenta con un instrumento GC-MS de cuadrupolo simple y otro instrumento de UHPLC-MS/MS), cuyas fotos pueden observarse a continuación.



Figura N.º 22. [Fotografía de Gerardo Caballero]. (Florencio Varela, 2019) Equipo de GC-MS.



Figura N.º 23. [Fotografía de Gerardo Caballero]. (Florencio Varela, 2019) Equipo de UHPLC-MS/MS.

Fuente: archivo personal de los autores.

Esto dos instrumentos forman parte del patrimonio del HEC el moderno equipo de UHPLC-MS/MS fue comprado con fondos propios del HEC. Por su parte, el equipo de GC-MS, como puede verse en la foto, es un equipo antiguo, reacondicionado con fondos del HEC, conseguido en 2014 por este equipo de investigación como donación por parte de la antigua Secretaría de Deporte de la Nación, luego de perseverantes gestiones de más de un año de duración ante las autoridades de ambas instituciones de aquella época. De esta manera, este instrumento se consiguió a un costo inferior al 10% de un instrumento nuevo.²¹

Con el instrumento de GC-MS estamos trabajando en un subproyecto de detección de acidemias orgánicas en orinas de niños y en otro sobre

21 Como curiosidad histórica, quizás al lector le interese saber que ese instrumento estuvo prestando servicios en el Laboratorio de Control de Doping de la secretaría mencionada, plenamente operativo durante los controles de dopaje de los Juegos Panamericanos llevados a cabo en Mar del Plata (1995) y del Mundial de Voleibol Masculino realizado en Buenos Aires (2002).

la determinación del perfil de ácidos grasos en muestras de plasma de pacientes afectados por alguno de los factores de riesgo del SM. Con este mismo instrumento trabajaremos en el futuro en el subproyecto de análisis químico de oleorresinas cicatrizantes, y en uno nuevo que surgió de conversaciones con personal médico del HEC, especializado en hipertensión pulmonar arterial (HPA). El instrumento de UHPLC-MS/MS está dedicado principalmente a las tareas del proyecto de metabolómica del SM. Relataremos a continuación las facetas más relevantes de estos proyectos.

5.1. Acidemias orgánicas

Este subproyecto está enfocado en el desarrollo de un método rápido de determinación de ácidos orgánicos en orina por técnicas de cromatografía de gases acoplada a EM. Los ácidos orgánicos, sustancias solubles en agua, son metabolitos intermediarios de todos los grupos principales de compuestos presentes en los diversos componentes celulares, tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y esteroides.²² La orina contiene cientos de ácidos orgánicos diferentes que provienen de diversas fuentes, las que incluyen el metabolismo normal y anormal. El análisis por GC-MS de estos compuestos es la base del diagnóstico de errores congénitos del metabolismo de ácidos orgánicos, trastornos metabólicos comúnmente conocidos como “acidemias o acidurias orgánicas”.

22 La denominación “ácidos orgánicos” corresponde a compuestos que contienen cadenas de átomos de carbono más hidrógeno y oxígeno en su estructura. Esta denominación se utiliza para diferenciarlos de los ácidos minerales como, por ejemplo, el ácido sulfúrico o el ácido fluorhídrico, ácido este dedicado a aplicaciones *non sanctas* por el famoso profesor de química Walter White, más conocido en los bajo fondos de Albuquerque como “Heisenberg”, de la serie *Breaking Bad*.

Estas acidemias están caracterizadas bioquímicamente por la acumulación de metabolitos inusuales no presentes en condiciones fisiológicas o por la acumulación de cantidades patológicas de metabolitos normales. Cuando un error congénito del metabolismo bloquea uno o más caminos metabólicos, el organismo canaliza los metabolitos intermediarios en exceso por caminos alternativos y, en el proceso, crea metabolitos y perfiles metabólicos anormales. Estos errores congénitos del metabolismo comprenden tres mecanismos bioquímicos principales que pueden derivar en perfiles metabólicos anormales. En un primer mecanismo, los metabolitos normales de un camino superior a una vía bloqueada pueden acumularse, como por ejemplo la acumulación de ácido glutárico en las acidurias glutáricas. Otro mecanismo es aquel donde se acumulan los metabolitos normales de vías superiores que no pueden alimentar una vía bloqueada. Un ejemplo es la acumulación de uracilo en un número de defectos del ciclo de la urea. En el tercer mecanismo, se forman metabolitos anormales cuando los intermediarios en exceso son dirigidos hacia caminos que usualmente no usan. Ejemplo de esto es la acumulación de aloisoleucina en la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce.

Cualquiera sea el desorden, todos ellos tienen un desarrollo común, la ocurrencia de enfermedad aguda con riesgo de muerte en la infancia temprana o retardo inexplicable del desarrollo con episodios intercurrentes de descompensación metabólica en la infancia avanzada. La incidencia de estos trastornos del metabolismo tomados colectivamente es de uno en mil nacidos vivos. La detección temprana de las acidurias orgánicas permite, en muchos casos, la implementación de terapias adecuadas necesarias para evitar las secuelas neurológicas permanentes que estos trastornos metabólicos pueden ocasionar (Rinaldo, Hahn y Matern, 2006). La detección rápida de estos trastornos metabólicos mediante técnicas de GC-MS permite una oportuna implementación de terapias apropiadas en pos de evitar o mitigar los daños que ellas ocasionan.

Resulta entonces esencial contar con un método rápido de análisis que haga posible la entrega de resultados en el menor tiempo posible desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio. Por esta razón, nuestro grupo apunta a acortar el tiempo de análisis global de los procedimientos de literatura, en uso en la práctica clínica de rutina.

La metodología de estudio de los ácidos orgánicos en muestras de orina comprende un procedimiento de tres etapas:

1. Aislamiento y separación de los ácidos orgánicos de la muestra fisiológica.
2. Transformación, por derivatización química, de los ácidos orgánicos en compuestos más estables y volátiles.
3. Separación e identificación por GC-MS de los compuestos derivatizados.

Los ácidos orgánicos producto del metabolismo normal y patológico son sustancias débilmente ácidas, que a los valores normales de pH de la orina se encuentran solubilizados en agua en forma de sales. Para poder extraer estas sustancias con un solvente orgánico (inmiscible con agua), se debe previamente acidificar la orina. De esta manera se consigue aislar los ácidos orgánicos, separándolos de todos los demás componentes solubles en agua de la orina. Los ácidos orgánicos como tales son sustancias polares, sensibles a altas temperaturas y de baja volatilidad, poco aptas para el análisis por cromatografía de gases, técnica analítica que se aplica a sustancias de volatilidad media a alta. Por esta razón, los ácidos orgánicos deben ser transformados químicamente en compuestos de mayor estabilidad térmica y mayor volatilidad (tales como éteres de sililo, compuestos que contienen silicio en su estructura) previamente a su análisis por cromatografía de gases.

La muestra extraída de orina y transformada químicamente como se describió contiene unos 30 a 40 compuestos diferentes. Estos pueden ser separados por el cromatógrafo de gases, que cuenta con una columna capilar por donde fluyen los componentes de la mezcla impulsados por el gas de transporte (helio). La columna capilar contiene una muy fina capa (décimas de micrómetros) de una sustancia polimérica que interactúa selectivamente con los componentes de la mezcla, lo que permite la separación progresiva de estos componentes a medida que avanzan por la columna. El cromatógrafo de gases está acoplado a un espectrómetro de masa, de manera tal que los componentes de la mezcla separados por el cromatógrafo ingresan de a uno por vez a la fuente del espectrómetro de masa. En la fuente, se genera un conjunto de iones mediante el método de ionización electrónica de cada una de las especies que ingresan a la fuente. Este conjunto de iones está compuesto por el ion molecular, el que permite determinar el peso molecular del componente individual, y por una variedad de iones fragmentos de menor masa que el ion molecular. Todos estos iones son, luego, expulsados de la fuente de iones mediante la aplicación de un voltaje de aceleración y se dirigen al analizador del espectrómetro de masa (un cuadrupolo), donde son barridos secuencialmente, y se obtiene así el espectro de masa junto con el tiempo de retención de la sustancia (el tiempo al cual la sustancia es detectada).

Recordemos que el espectro de masa de una sustancia individual es una especie de “huella digital”, donde en primera instancia se buscan los dos iones más significativos del espectro: el ion molecular (ion que permite la determinación del peso molecular de la sustancia) y el pico base (el ion más abundante del espectro). El análisis de estos iones y del conjunto de iones que constituye el espectro de masa, más el dato de tiempo de retención, nos permiten la identificación de la estructura de la sustancia por búsqueda en biblioteca de espectros guiada por la in-

interpretación manual de los espectros por parte del analista. La interpretación manual es crucial para verificar que la asignación de estructuras propuesta por el *software* de búsqueda sea químicamente lógica.

Los espectros de masa son unívocos de cada sustancia individual porque la formación de un determinado conjunto de iones sigue un patrón lógico de reacciones químicas de descomposición en fase gaseosa (la fase en la que se encuentra las sustancias a lo largo de todo su recorrido por un equipo de GC-MS) que depende de la estructura molecular de cada una de las sustancias. Estos espectros de masa se obtienen por un barrido completo del cuadrupolo analizador dentro de un rango de masas prefijado por el operador. Alternativamente, el cuadrupolo analizador puede sintonizarse para que deje pasar solo dos o tres iones representativos de cada compuesto individual –usualmente el ion molecular y el pico base más otro ion abundante–, método conocido como “monitoreo selectivo de iones” (*Selected Ion Monitoring*, por su sigla en inglés: SIM). Esta técnica permite detectar sustancias de estructura conocida con mayor sensibilidad que el método del barrido completo del rango de masas. Por ejemplo, si el método de barrido completo permite detectar una sustancia cuya concentración en orina es del orden de los cientos de nanogramos por mililitro de orina, el método SIM puede detectar 1 ng por ml, o menos, de la misma sustancia.

Por otra parte, el conjunto de iones pertenecientes a una determinada especie química es registrado durante todo el tiempo que reside en el espectrómetro de masa, lo que genera así una señal de forma de campana cuya área se calcula. Esta área es proporcional a la cantidad de la sustancia presente originalmente en la orina, de manera que con calibradores adecuados puede tenerse un valor de concentración de la sustancia en orina (mg/l, por ejemplo), valor que rápidamente puede asociarse a condiciones normales o patológicas del metabolismo.

Los métodos de análisis de ácidos orgánicos en orina actualmente existentes hacen uso de dos etapas de extracción con solvente orgánico para el aislamiento y la separación de los ácidos orgánicos de la muestra de orina (que implica hasta dos horas de reacción en la etapa de derivatización de los ácidos orgánicos) y un programa de cromatografía de gases de 67 minutos de duración (Jones y Bennett, 2010). Estos tiempos nos parecieron excesivos, por lo que nuestro trabajo de investigación se enfocó en estudiar alternativas al protocolo estándar de análisis de ácidos orgánicos en orina que resultaran en una metodología optimizada de menor tiempo de duración por muestra desde el inicio de la preparación hasta el informe final.

Al presente, hemos conseguido resultados alentadores. Trabajando con una serie de ácidos orgánicos naturales accesibles comercialmente, pudimos reducir significativamente el tiempo total de preparación de las muestras y el tiempo propio del análisis por GC-MS. En efecto, por un lado, demostramos que solo es necesaria una etapa de extracción de los ácidos orgánicos de las muestras de orina y que 30 minutos de reacción son suficientes para transformar completamente los ácidos orgánicos en sus derivados aptos para el análisis por cromatografía de gases. Así, el tiempo total del análisis por GC-MS fue reducido de 67 a 33 minutos, sin sacrificar resolución cromatográfica. Disponemos ahora de una pequeña base de datos con los tiempos de retención y los espectros de masa de un conjunto de ácidos orgánicos normalmente excretados en orina. Estos espectros de masa proveen los valores numéricos de las masas del ion molecular y del pico base. Este conjunto de datos de cada sustancia (tiempo de retención, ion molecular y pico base) nos permitirá la construcción de un método de EM SIM. Adicionalmente, con el *software* de procesamiento de datos tomaremos esos datos característicos de cada sustancia para armar un reporte constituido por un conjunto de pares de ventanas (un par por cada compuesto individual, una ventana para el ion molecular, la otra para el pico base). En este con-

junto, cada par estará centrado al valor del tiempo de retención de cada componente individual de la mezcla. Este tipo de informe acelera la inspección manual de los cromatogramas individuales correspondientes a las muestras bajo estudio y facilita, de esta manera, el análisis completo de un conjunto numeroso de muestras en tiempos muy cortos.

Una vez puesta a punto esta última parte de la metodología analítica, estimamos una reducción significativa, dos o tres horas, del tiempo total del procedimiento analítico respecto a métodos similares publicados en literatura y actualmente en uso por diversos laboratorios de análisis clínicos.

5.2. Lipidómica del síndrome metabólico

El SM es una entidad clínica altamente prevalente caracterizada por una combinación de cuatro factores de riesgo (diabetes tipo 2, dislipidemias, obesidad central e hipertensión arterial; a los cuales se ha agregado recientemente un nuevo fenotipo: la enfermedad del hígado graso de etiología no alcohólica) que suele desembocar en enfermedad cardiovascular. De estos factores de riesgo, la dislipidemia puede diagnosticarse mediante análisis de rutina de los niveles de colesterol y triglicéridos. Sin embargo, el creciente número de personas con enfermedades metabólicas demanda estudios más detallados de los lípidos, tanto para propósitos de diagnóstico como para control de la eficacia de tratamientos terapéuticos.

Dentro del conjunto de lípidos se encuentran los ácidos grasos, llamados así porque se obtienen mediante reacciones de hidrólisis de sustancias grasas. Estos compuestos se encuentran formando parte de lípidos complejos o, también, libres en circulación por sangre. Estos ácidos grasos libres provienen de diversas fuentes: dieta, liberación desde tejido adiposo y biosíntesis (es decir, síntesis en el propio organismo a

partir de compuestos más simples). Se sabe que los niveles y el perfil de los ácidos grasos plasmáticos están relacionados a ciertos factores de riesgo asociados al SM. Por ejemplo, la mayoría de las personas obesas tienen altos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, debido a una mayor liberación desde el tejido adiposo expandido. El aumento a largo plazo en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres finalmente inhibe la acción antilipolítica de la insulina, lo cual incrementa más aún la velocidad de su liberación a la circulación y contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y al desarrollo de diabetes de tipo 2 (Boden, 2006). Sin embargo, no todos los tipos de ácidos grasos contribuyen igualmente a la alteración sistémica de la acción de la insulina, ya que la grasa rica en ácidos grasos saturados promueve resistencia a la insulina, pero los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados la reducen (Riccardi, Giacco y Rivellese, 2004).

A su vez, en la categoría de lípidos esteroides está el colesterol, el más abundante de los esteroides plasmáticos, que existe tanto libre como esterificado con ácidos grasos; habiéndose encontrado en plasma más de veintidós especies diferentes de ésteres²³ de colesterol (Quehenberger et al., 2010). El plasma humano contiene también campesterol y sitosterol, los cuales no son sintetizados en humanos, sino que provienen enteramente de la dieta de origen vegetal. En personas normales, estos esteroides vegetales están presentes solo en pequeñas cantidades (ya que el colesterol es más del 99% de todos los esteroides circulantes), pero en la sitosterolemia, los niveles en plasma de esteroides vegetales están marcadamente elevados. En estos casos se hace necesario un panel completo de esteroides plasmáticos para determinar el diagnóstico diferencial y

23 Quizás el lector se pregunte qué es un éster. Un éster es un compuesto formado por carbono, hidrógeno y oxígeno, producto de una reacción entre un ácido orgánico y un alcohol.

seleccionar el mejor tratamiento. Otro esteroide de relevancia terapéutica presente en el plasma normal es el latosterol, precursor biosintético del colesterol. El latosterol puede tener valor diagnóstico como indicador de la síntesis corporal de colesterol (Björkhem et al., 1987), ya que el latosterol se encuentra solamente en circulación, pero el colesterol total es la suma del colesterol sintetizado por el propio organismo más el colesterol de origen dietario.

En este subproyecto, nos propusimos el estudio cualicuantitativo del perfil de ácidos grasos libres y totales en muestras de plasma de individuos del grupo con factores de riesgo y del grupo control mediante técnicas de GC-MS. Para esto, organizamos el perfil global en las subclases de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Hemos planteado la hipótesis de que los distintos fenotipos del SM presentarán perfiles lipídicos diferentes. Asimismo, en una etapa posterior estudiaremos el perfil cualicuantitativo de esteroides libres y totales en muestras de plasma de ambos grupos mediante técnicas de GC-MS. Los datos globales del grupo control permitirán tener valores de referencia de población sana del área metropolitana, y se evaluará si el perfil global de esteroides, en particular la concentración del latosterol, permite discriminar entre individuos de ambos grupos.

Para el análisis de ácidos grasos en plasma, en primer lugar, hemos trabajado exitosamente con una muestra de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos comerciales, y logramos una efectiva separación por cromatografía de gases y una completa identificación por EM de cada uno de los 37 compuestos. El uso de los ésteres metílicos en vez de los ácidos grasos como tales es práctica usual en los trabajos de análisis de lípidos, ya que los primeros poseen mejores propiedades cromatográficas que los segundos y, por lo tanto, pueden ser separados con mayor facilidad.

La transformación química de ácidos grasos en sus ésteres metílicos es también relativamente simple: se consigue por reacción con metanol, en presencia de cantidades ínfimas de ácido clorhídrico calentado a 100 °C durante unos 60 minutos. Asimismo, la extracción y transformación en sus ésteres metílicos de todos los ácidos grasos presentes en una muestra de plasma, tanto los ligados a lípidos complejos como los libres en circulación, se consigue también con relativa facilidad por un protocolo similar al recién descrito. Este protocolo aplicado a una muestra de plasma posibilita la metilación de los ácidos grasos libres y también la metilación de los ácidos grasos ligados a lípidos complejos mediante una reacción química denominada “transesterificación”. Ahora una aclaración: una transesterificación (palabra un poco complicada de pronunciar) es una reacción química de transformación de un determinado tipo de éster en otra clase de éster, es decir, permite la conversión de un éster complejo en uno simple y viceversa. Volviendo al protocolo, la reacción de metilación de todos los ácidos grasos la conseguimos disolviendo la muestra de plasma en un exceso de metanol que contiene ácido clorhídrico y calentado esa solución como se describió arriba.

Una vez concluida la reacción química, agregamos hexano al medio de reacción, un solvente inmiscible con agua y metanol que consigue la extracción de los ésteres metílicos desde la fase acuosa hacia la fase hexano (el hexano es un hidrocarburo de estructura y comportamiento físico-químico similar a muchos de los compuestos presentes en las naftas). Esta fase hexano así obtenida es la que luego se inyecta en el instrumento de GC-MS. Mediante este protocolo hemos llegado a analizar satisfactoriamente una serie de muestras de plasma de voluntarios sanos y logramos identificar unos 19 ésteres metílicos de ácidos grasos presentes. Terminado esto, comenzamos el desarrollo de la parte final del protocolo: la puesta a punto de la metodología de integración de las señales de cada uno de estos ésteres (es decir, la determinación

de su área), que permite la posterior cuantificación de estos analitos. En eso estamos, pero...

Pero, todo puede fallar, como decía aquel célebre ilusionista televisivo. Y en nuestro mejor momento comenzó a fallar el *software* operativo del instrumento de GC-MS. Nuestros vaivenes con este *software* son largos y hasta aburridos, pero un breve relato quizás ayude al lector a comprender mejor ciertas peripecias habituales en el día a día de la actividad científica y hasta qué punto la informática está comprometida en la ciencia actual. Como decíamos, este instrumento corresponde a un modelo de los 90, el cual, si bien es robusto, solo puede ser operado con una versión también antigua del *software* propio de Agilent (la empresa en la que se transformó la antigua Hewlett-Packard), que corre en entornos Windows hoy en día obsoletos (Windows 2000 y XP). Y para nuestro pesar, repentinamente, comenzaron los problemas con el *software*; no podíamos hacer correr una secuencia de inyección. Este equipo, al igual que todos los instrumentos modernos de cromatografía acoplada a EM, está provisto de un inyector automático, el cual manipula una jeringa que logra inyecciones muy precisas de volúmenes muy pequeños (del orden de los microlitros, es decir, milésimas de mililitro). Entonces, en un día normal de trabajo pueden prepararse alrededor de unas 20 o 30 muestras, las que en la etapa final del protocolo son transferidas a sendos viales de unos 0,5 ml de capacidad, luego colocados en el carrusel del inyector automático. Después, mediante el *software*, se escribe la secuencia de inyección, es decir, el listado de viales a inyectar con sus correspondientes nombres de muestra y método de análisis –el que tiene incorporado todos los parámetros operativos del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masa– y se da comienzo a la secuencia. A partir de ese momento, el instrumento puede trabajar automáticamente y el responsable del trabajo puede dedicarse a otra cosa. Por ejemplo, puede irse a su casa a escuchar buena música (Beethoven, King Crimson, Mercedes Sosa, Miles Davis, Yes, entre otros) sabiendo, tranquilo y relajado,

que al día siguiente tendrá todos los análisis completados, y solo tendrá que dedicarse al análisis de los datos obtenidos. Entonces, sin secuencia de inyección automática no es posible analizar lotes de muchas muestras en tiempos razonables, y tampoco es posible obtener resultados reproducibles y precisos. Como decíamos, todo puede fallar, menos la fuerza de voluntad y la perseverancia. En breve tendremos resuelto el problema del *software* y seguiremos adelante con lo planificado.

5.3. Ácidos grasos y sus metabolitos en circulación. Explorando potenciales biomarcadores de la hipertensión pulmonar arterial

Este es un proyecto surgido de charlas amenas e informales con personal médico de Unidad de Neumonología del HEC, que plantea el propósito de extender nuestra experiencia en análisis de ácidos grasos en plasma hacia otras patologías, específicamente la HPA. ¿Por qué estudiar los ácidos grasos en el contexto de esta enfermedad? Veamos qué es lo que se sabe de esta y su relación con los ácidos grasos.

La HPA es una enfermedad compleja multifactorial caracterizada por un aumento en la resistencia vascular pulmonaria y por procesos de remodelación vascular, que conducen a la disfunción del ventrículo derecho (DVD). Existe evidencia creciente de que la DVD observada en la HPA puede estar asociada con algunos componentes del SM, como por ejemplo la resistencia a la insulina (Talati y Hemnes, 2015). La relación entre la DVD y los metabolitos de ácidos grasos/glucosa en la HPA está caracterizada por un corrimiento en la utilización de fuentes de energía hacia un incremento en la utilización de glucosa y una disminución del consumo de ácidos grasos. La DVD puede estar causada por un metabolismo de ácidos grasos mal adaptado, que resultó de un incremento

en la absorción de estos y un desbalance entre la oxidación de ácidos grasos y glucosa en las mitocondrias. Existe también una relación probada entre los ácidos grasos y los procesos inflamatorios, donde las mitocondrias juegan un rol central. Por estas razones, las investigaciones en lípidos asociados a la HPA podrían abrir un abanico de posibilidades en diferentes niveles. No solo permitirían una aproximación a una explicación profunda de los procesos fisiológicos relacionados al desarrollo y a la evolución de la HPA, sino que también podrían ser la herramienta para el descubrimiento de metabolitos claves de la patogenia. Estos metabolitos funcionarían como biomarcadores de diagnóstico y seguimiento, brindando una evaluación más precisa del tratamiento y pronosis de la patología.

Aprovechando la experiencia adquirida en el desarrollo del proyecto de lípidos en el contexto del SM, y en colaboración directa con el grupo de HPA del HEC, nos hemos propuesto establecer una metodología analítica robusta basada en GC-MS para la caracterización y cuantificación de ácidos grasos en plasma de pacientes sanos y de pacientes diagnosticados con HPA. Planteamos la hipótesis de que la determinación de estos perfiles de ácidos grasos brindará diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en estudio, de las que surgiría información sobre los procesos fisiológicos y metabólicos asociados a la HPA. Por otro lado, este análisis facilitaría el descubrimiento de metabolitos útiles como biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de la HPA. Al presente, el proyecto se encuentra en la etapa de recolección de muestras de plasma de pacientes que sufren algunas de las variantes de la HPA y de pacientes sanos.

5.4. Metabolómica del síndrome metabólico

El título de este proyecto parece un trabalenguas, trataremos de explicar en qué consiste con la mayor simpleza posible. Como describimos, la

metabolómica implica el estudio del conjunto de los metabolitos presentes en algún fluido biológico (o tejido) de un individuo, sea este sano o portador de alguna enfermedad. En nuestro caso, la patología a estudiar es el SM y el fluido biológico es el plasma. Entonces, la propuesta es la utilización de la metabolómica para caracterizar el conjunto de metabolitos de los fenotipos intermedios del SM con el fin último del descubrimiento de biomarcadores aptos para diagnósticos y pronósticos, útiles como indicadores de la eficacia terapéutica de diversos tratamientos.

La meta última es producir una comprensión más completa de cómo las características metabólicas son afectadas por varias condiciones fisiopatológicas y emplear tal conocimiento en investigación traslacional, es decir, investigación básica cuyos resultados puedan ser rápidamente trasladados a la práctica clínica. Utilizaremos la técnica de UHPLC-MS/MS con la cual analizaremos muestras de plasma de pacientes normales (grupo control) y de pacientes con uno, dos, tres o cuatro de los factores de riesgo asociados al SM. Este trabajo se plantea como un estudio observacional y prospectivo. Las muestras se seleccionan de acuerdo con el diseño factorial $2 \times 2 \times 2 \times 2$ de los factores de riesgo metabólicos. Con este diseño, esperamos ser capaces de estudiar la asociación de cada factor de riesgo correspondiente con los niveles de metabolitos, así como la asociación de los niveles de metabolitos a través de las 16 combinaciones posibles de los cuatro factores de riesgo.

Este proyecto todavía se encuentra en la etapa de recolección de muestras, pero en breve iniciaremos los ensayos de puesta a punto de la metodología de cromatografía-EM con patrones de metabolitos pre-seleccionados. Dadas las características técnicas del espectrómetro de masa, nuestro estudio metabolómico será direccionado. Luego de esta puesta a punto inicial, planificamos una etapa siguiente de preparación de muestras de plasma. Este será tratado con metanol para precipitar

proteínas, y se tomará a continuación la fase líquida sobrenadante que contiene el conjunto de metabolitos (hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.). Las muestras así preparadas serán inyectadas en el instrumento de UHPLC-MS/MS, los datos crudos obtenidos serán filtrados con *softwares ad hoc*, y los datos así procesados serán sometidos finalmente a análisis estadístico multivariante.

Esperamos que el lector haya encontrado agradable e interesante nuestro relato. Quizás, luego de esta lectura, quiera saber más sobre la EM, la bioquímica, la metabolómica, las enfermedades raras y los usos de la EM en estos campos. De ser así, lo alentamos a seguir leyendo, a seguir estudiando; y tal vez un día se convierta en un practicante más de este atrapante arte que es la EM. El trabajo diario en esta tecnología analítica es desafiante y al mismo tiempo muy estimulante intelectualmente. En algunas situaciones debemos interpretar los espectros de masa con el objetivo de resolver la estructura química del compuesto que le dio origen. Este proceso es similar a la resolución de un rompecabezas, juego de ingenio o acertijo lógico; y la satisfacción personal que se logra cuando resolvemos el problema quizás sea parecida a la del investigador policial cuando encuentra al responsable de un crimen. Por esto y mucho más, nos sentimos muy afortunados y agradecidos de trabajar en lo que nos apasiona. Pero, no solo de EM vive el hombre, también nos gusta la música, y de alguna manera la practicamos, como muchos científicos de esta y otras disciplinas. En el mundo de la EM, tenemos el ejemplo de Francis Aston quien era un eximio violinista y pianista que solía dar conciertos en la Universidad de Cambridge allá por 1920. Sin embargo, como describimos en algunas partes de este texto, también se requiere temple y perseverancia porque muchas veces los experimentos no funcionan como uno desea, los insumos necesarios no llegan en tiempo y forma, los fondos son insuficientes, y los equipos pueden tener fallas imprevistas en la electrónica, en alguna parte mecánica o en el *software*. Nada de esto debe desalentarnos, cuando aparecen

las dificultades los esfuerzos deben redoblar. Si nos gusta tanto lo que hacemos, ¿por qué deberíamos rendirnos? No, no está en nuestro ADN. Ni en nuestras proteínas ni en nuestros metabolitos. Entonces, cuando aparecen las dificultades, y a pesar de estar del lado del ecuador donde la actividad científica tiene más obstáculos, debemos siempre recordar y ser fieles a las enseñanzas del maestro John Fenn: las tareas difíciles se pueden completar rápidamente, las imposibles demoran un poco más.

- Anderson, N. L. y Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19, 1853-1861.
- Anker, J. (1932). Wilhelm Johannsen. En V. Meisen. *Prominent Danish Scientists through the Ages* (pp. 177-180). Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Balog, J., Szaniszlo, T., Schaefer, K. C., Lopata, A., Godorhazy, L., Szalay, D., Balogh, L., Sasi-Szabo, L., Toth, M., Takats, Z. (2010). Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82, 7343-7350.
- Biemann, K. (1994). The Massachusetts Institute of Technology Mass Spectrometry School. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 332-338.
- Björkhem, I., Miettinen, T., Reihner, E., Ewerth, S., Angelin, B. y Einarsson, K. (1987). Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMGCoA reductase in human liver. *Journal of Lipid Research*, 28, 1137-1143.
- Boden, G. (2006). Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Current Diabetes Report*, pp. 177-181.

- Brown, T.H., LeMay Jr., H.E., Bursten, B.E. y Burdge, J. R. (2004). *Química. La Ciencia Central*. México: Pearson Educación.
- Canete, A., Abunaji, Y., Alvarez-Calatayud, G., De Vicente, M., González Holguera, J. A., Leralta, M., Pajares, J. M. y Gisbert, J. P. (2003). Breath test using a single 50-mg dose of ¹³C-urea to detect *Helicobacter pylori* infection in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 36, 105-111.
- Cerejido, M. (2004). *Ciencia sin seso, locura doble*. Madrid: Siglo XXI.
- Chace, D. H., Kalas, T. A. y Naylor, E. W. (2002). The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3, 17-45.
- Cohen-Kaminsky, S., Nakhleh, M., Perros, F., Montani, D., Girerd, B., Garcia, G., Simonneau, G., Haick, H., y Humbert M. (2013). A proof of concept for the detection and classification of pulmonary arterial hypertension through breath analysis with a sensor array. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188, 756-759.
- Devlin, T. M. (2008). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté.
- Ecker, D. J., Sampath, R., Li, H., Massire, C., Matthews, H. E., Toleno, D., Hall, T., Blyn, L., Eshoo, M., Ranken, R., Hofstadler, S. y Tang Y. (2010). New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Review Molecular Diagnosis*, 10, 399-415.

- Eliuk, S. y Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8, 61-80.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. y Whitehouse, M. (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246, 64-71.
- Fenn, J. B. (2003). Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 3871-3894.
- Fenselau, C. (2015). Carl Djerassi (1923-2015): An Obituary for Chemists. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 26, 535-537.
- Finehout, E. J. y Lee, K. H. (2004). An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 32, 93-104.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A. y Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
- Grayson, M. A. (2002). *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*. Philadelphia: Chemical Heritage Press.
- Gregory, S. G., Barlow, K. F. et al. (2006). The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, 441, 315-321.

- Griffiths, J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(15), pp. 5678-5683.
- Hillenkamp, F. y Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200, 71-77.
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J. y Lay, J. O. Jr (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), 1227-32.
- Jannetto, P. J. y Fitzgerald, R. L. (2016). Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*, 62, 92-98.
- Jones, P. M. y Bennett, M. J. (2010). Urine Organic Acid Analysis for Inherited Metabolic Disease Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. En U. Garg y C. A. Hammett-Stabler (Eds.). *Clinical Applications of Mass Spectrometry* (pp. 423-432). Nueva York: Humana Press.
- Kanehisa, M. and Goto, S.; (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28, 27-30.
- Karas, M., Bachmann, D. y Hillenkamp, F. (1985). Influence of the Wavelength in High Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Analytical Chemistry*, 57(14), 2935-2939.

- Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988). Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10.000 Daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301.
- Klimovsky, G. (2005). *Las desventuras del conocimiento científico*. Buenos Aires: AZ Editora.
- Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., Westwood, F. R., Davies, D., Major, H. y Wilson, I. D. (2005). Metabonomics with ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomarkers*, 10, 173-87.
- Lu, X., Zhao, X., Bai, C., Zhao, C., Lum G. y Xu, G. (2008). LC-MS-based metabonomics analysis. *Journal of Chromatography B*, 866, 64-76.
- Luscombe, N. M., Greenbaum, D. y Gerstein, M. (2001). What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods of Information in Medicine*. 40, 346-358.
- Maddox, B. (2003). The double helix and the “wronged heroin”. *Nature*, 421, 407-408.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1156-1162.
- Maldonado, P. (2019). *¿Por qué tenemos el cerebro en la cabeza?* Santiago de Chile: Penguin Random House.

- McLafferty, F. W. (2008). Mass spectrometry across the sciences. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 105, 18088-18089.
- McLafferty, F. y Tureček, F. (1993). *Interpretation of Mass Spectra*. California: University Science Books.
- Miller, P. E. y Bonner Denton, M. (1986). The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *Journal of Chemical Education*, 63, 617-622.
- Nicholson, J. K. y Lindon, J. C. (2008). Metabonomics. *Nature*, 455, 1054-1056.
- Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 61, 100-111.
- Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. y Wells, I. (1949). Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*, 110, 543-548.
- Peat, M. A. (1995). Financial viability of screening for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*, 41, 805-808.
- Peters, D. L, Wang, W., Zhang, X., Ning, Z., Mayne, J. y Figeys, D. (2019). Metaproteomic and Metabolomic Approaches for Characterizing the Gut Microbiome. *Proteomics*, 19, 1800363-1800434.
- Quehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S.B., Myers, D.S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R.L., Sullards, C.M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz C. R., Guan, Z., Laird, G. M., Six, D.A.,

- Russell, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy, E. y Dennis, E. A. (2010). Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research*, 51, 3299-3305.
- Riccardi, G., Giacco, R. y Rivellesse, A. A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 23, 447-456.
- Rinaldo, P., Hahn, S. y Matern, D. (2006). Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. En C. A. Burtis, E. R. Ashwood y D. E. Bruns (Eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Missouri: Elsevier Saunders.
- Sagan, C. (1977). *The Dragons of Eden: Speculations on the Evolution of Human Intelligence*. Nueva York: Random House.
- Sanger, F. y Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94, 441-448.
- Sanger, F. y Thompson, E. O. (1953). The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochemistry Journal*, 53, 353-366.
- Seeley, E. H. y Caprioli, R. M. (2008). Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 105, 18126-18131.
- Shulman, G. I. y Petersen K. F. (2017). Metabolism. En W.F. Boron y E. L. Boulpaep (Eds.). *Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier.

- Stern, J. G. y Gaucher, E. A. (2015). Accessing and applying molecular history. *Peer Journal PrePrints* 3:e1293v1. doi: 10.7287/peerj.preprints.1293v1
- Talati, M. y Hemnes, A. (2015). Fatty acid metabolism in pulmonary arterial hypertension: role in right ventricular dysfunction and hypertrophy. *Pulmonary Circulation*, 5, 269-278.
- Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., Stamper, P. D., Zhang, S. X. y Carroll, K. C. (2012). Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3301-3308.
- Thomas, A., Heath Patterson, N., Laveaux Charbonneau, J. y Chaurand, P. (2013). Orthogonal organic and aqueous-based washes of tissue sections to enhance protein sensitivity by MALDI imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(1), 42-48.
- Van Heyningen, V. (2019). Genome sequencing – the dawn of a game-changing era. *Heredity*, 123, 58-66.
- Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953). A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171, 737-738.
- Yu, Z., Ning, Y., Yu, H. y Tang, N. (2014). A HPLC-Q-TOF-MS-based urinary metabolomic approach to identification of potential biomarkers of metabolic syndrome. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 34, 276-283.

AGRADECIMIENTOS

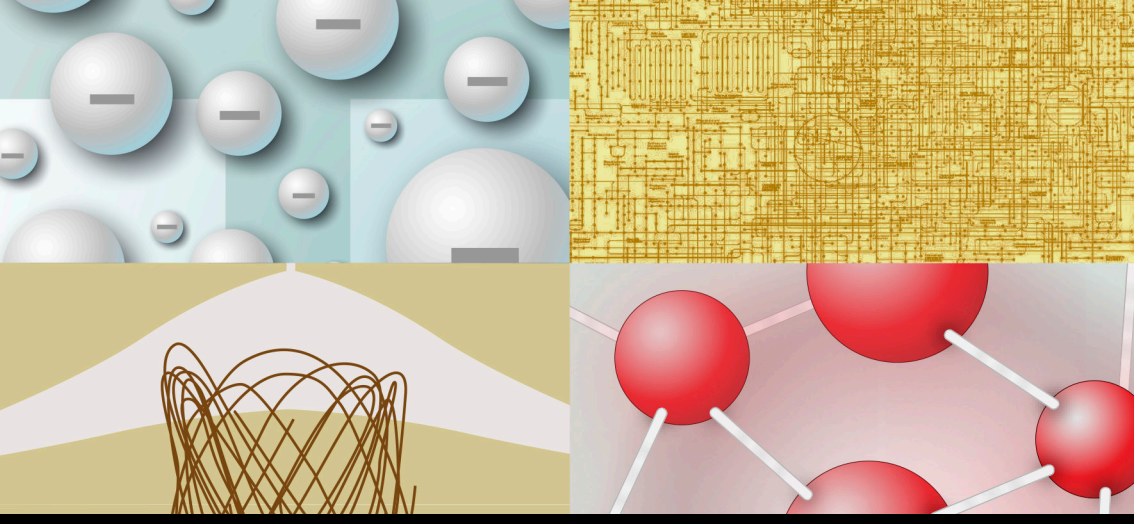
A Leandro David Dalceggio, del Área de Sistemas de Información Sistemas Informáticos del Hospital El Cruce, por su dedicación y empeño en el asesoramiento con las cuestiones referidas al *software*.

A la Universidad Nacional Arturo Jauretche por su apoyo financiero parcial para la realización de nuestros proyectos.

Al Hospital El Cruce por brindarnos el lugar y el equipamiento de trabajo.

Gerardo Manuel Caballero es Licenciado y Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires. Profesor titular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Arturo Jauretche, y del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. Autor y coautor de trabajos científicos publicados en revistas internacionales con referato en el campo de la química orgánica, la química analítica y la espectrometría de masa. Director del proyecto de investigación “Aplicaciones biomédicas de la Espectrometría de Masa” financiado por la UNAJ.

Mariano Hernán García es Bioquímico de la Universidad de Buenos Aires. Profesor adjunto del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Arturo Jauretche. Ex docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y de Odontología de la UBA, y de la Universidad Maimónides. Ha participado de proyectos, como investigador y codirector, en síntesis y caracterización de imidazolidinas, manejo de calcio en músculo liso, y metabólica. Autor y coautor de trabajos científicos en revistas internacionales con referato y de libros de divulgación científica. Actualmente se encuentra desarrollando su tesis doctoral vinculada a la metabólica.



La espectrometría de masa es una técnica analítica que ha revolucionado la química en todos sus campos. En los últimos años, diversos avances tecnológicos han permitido su incorporación en áreas de la investigación biomédica, y en laboratorios clínicos. Los autores, profesores del Instituto de Ciencias de la Salud de la UNAJ, la emplean en trabajos de investigación que se desarrollan en el Laboratorio N°1 del CEMET del Hospital El Cruce. En este texto de divulgación se relatan algunos hitos en la historia de la técnica, y se presentan los conceptos básicos para entender cómo funciona un espectrómetro de masa y qué información brinda. Se explican también algunos conceptos centrales de la bioquímica hasta llegar a la nueva disciplina de la metabolómica, y al mundo de las aplicaciones específicas de la espectrometría de masa, en la biología y la salud. Finalmente, se describen los proyectos de investigación de los autores, con énfasis en los estudios de acidemias orgánicas y lipidómica.