

1.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la espectrometría de masas (EM) ha sido incorporada a numerosos laboratorios clínicos tanto de análisis o bioquímica clínica como de microbiología. Sin embargo, el inicio de la tecnología de la EM se remonta mucho tiempo atrás; siendo el primer Premio Nobel de EM en el año 1922 al físico y químico Francis William Aston, que consiguió identificar numerosos isótopos no radioactivos con su espectrómetro de masas¹. No obstante, han sido dos avances importantes en la EM los precursores de los actuales equipos presentes en los laboratorios clínicos. Por un lado, en 1987 se inventó la desorción ionización

con láser asistida por matriz (MALDI), por Michael Karas y Franz Hillenkamp; con este sistema de ionización suave se impedía la degradación o fragmentación de proteínas de alto peso molecular, simplificando el espectro de masas, además de favorecer la ionización, evitando el efecto matriz de numerosas moléculas orgánicas. Esto fue imprescindible para la incorporación de la EM a los laboratorios de microbiología clínica. Y, por otro lado, en 1989 John Bennett Fenn descubrió la ionización por electroespray (ESI), donde la muestra pasa de una fase líquida, compuesta de pequeñas gotas con carga, a una gaseosa. Este otro avance permitió la incorporación de la EM en otros ámbitos del laboratorio de rutina (análisis clínicos y bioquímica clínica)²⁻⁵.

Por tanto, estos dos avances tecnológicos han permitido la obtención espectros de masas capaces de identificar y cuantificar metabolitos de manera adecuada, así

como la obtención perfiles proteicos concluyentes; siendo los responsables de la incorporación en la última década de los espectrómetros de masas a los laboratorios de rutina².

1.1.1. Fundamento de la técnica²⁻⁴

Un espectrómetro de masas consta básicamente de tres *elementos*: primero, la fuente de ionización; a continuación, el analizador de masas, y finalmente, el detector. Se consigue que los átomos o moléculas de una determinada muestra se ionicen, se separen y se detecten en una fase gaseosa².

Fuente de ionización

Hay dos *fuentes básicas de ionización* presentes en la mayoría de los espectrómetros de masas de los laboratorios clínicos: MALDI y ESI:

- *MALDI*. Usa una matriz orgánica en la que se encuentra la muestra a analizar –en mucha menor proporción que la matriz–; esta matriz capta la energía de un láser transfiriendo parte a las moléculas de la muestra, de forma que las ioniza. Esa energía procedente de la irradiación láser desestructura la matriz, cristalizada por el contacto con el aire, apareciendo una nube de iones que salen de esta como consecuencia de un campo eléctrico en el que se aceleran por la carga que presentan. Posteriormente, se dirigen al analizador de masas y después al detector² (Figura 1a).
- *ESI*. Se utiliza un disolvente orgánico en el que se disuelve la muestra a analizar, que pasa por un capilar metálico en cuyo extremo se le aplica un potencial –hay un electrodo en el capilar y otro en el detector, generando una diferencia de potencial– y una presión de una atmósfera.

Cuando la muestra abandona el capilar se produce una nube de gotas de reducido tamaño con elevada carga, originando iones en fase gaseosa al evaporarse el solvente² (Figura 1b).

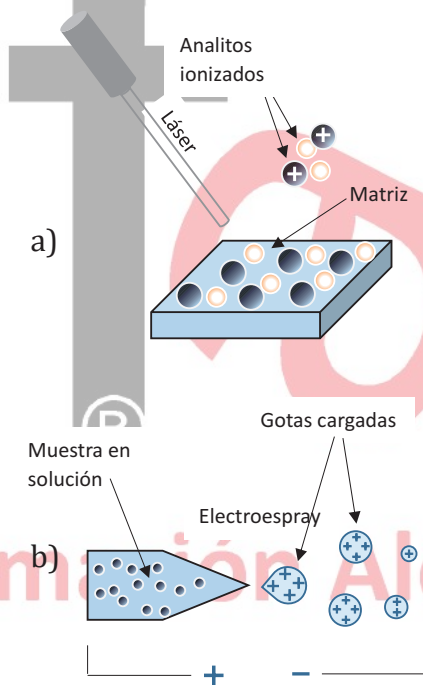


Figura 1. Sistemas de ionización en la EM.
a) Sistema MALDI; b) Sistema ESI.

Analizador de masas

Existen varios *tipos de analizadores de masas* (Figura 2); en microbiología, junto con el ionizador MALDI, el más usado es el *analizador TOF (tiempo de vuelo)*: Este analizador se fundamenta en las diferentes velocidades que adquieren los iones acelerados en el campo eléctrico. Dado que la energía cinética que se les aplica es la misma, aquella diferencia en la velocidad va a depender de la relación masa/carga (m/z) y, por consiguiente, el tiempo necesario para llegar al detector dependerá de aquella ratio^{2,3}.

Otro analizador comúnmente usado en los actuales espectrómetros de masas es el *cuadrupolo*: Se trata de cuatro barras alargadas, paralelas y conectadas eléctricamente entre sí; a estas barras se les aplica un determinado potencial de corriente continua y de radiofrecuencia. De manera que un de-

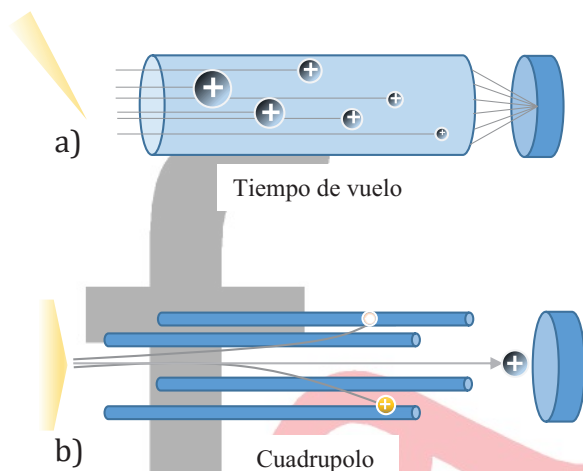


Figura 2. Analizador/detector de masas en la EM.
a) Sistema TOF; b) Sistema cuadrupolar.

terminado ion, procedente de la fuente de ionización, al atravesar esta estructura para llegar al analizador se puede ver modificada su trayectoria para una determinada combinación de potencial aplicado al cuadrupolo. Por tanto, aquella desviación va a depender de la ratio m/z para aquel potencial concreto, impactando en el detector exclusivamente aquellos iones “compatibles”

con el potencial aplicado en el cuadrupolo; los iones desviados no impactan en el detector y, por tanto, no se registran^{3,4}.

Detector

Es la última parte del espectrómetro de masas, donde se detectan y registran todos los iones que llegan a él. Como resultado de estos datos se van a generar unos espectros de masas correspondientes a los átomos o moléculas ionizadas, que en el caso del TOF va a estar relacionado con el tiempo empleado por aquellos en llegar a este elemento del espectrómetro de masas –explicado por la ratio m/z –. Y en caso del analizador tipo cuadrupolo, además, va a depender del potencial cuadrupolar aplicado y, por tanto, para obtener el espectro de masas, a diferencia del TOF, se van a necesitar de varios barridos a diferentes potenciales para obtener dicho espectro de masas^{2,3} (Figura 2).

1.1.2. Utilidades de la espectrometría de masas en el laboratorio clínico

1.1.2.1. Cribado neonatal y confirmación

El primer sistema de tamizaje neonatal descrito se remonta al año 1958, consistente en la identificación de ácido fenilpirúvico en la orina de recién nacidos de tres semanas. Posteriormente, en 1963 Guthrie hizo uso de sangre capilar en el análisis de la fenilalanina, sumandose el hipotiroidismo congénito al tamiz neonatal en el año 1970. Sin embargo, fue en la década de 1990 cuando se inició el empuje en los programas de cribado neonatal –con la determinación de acilcarnitinas y aminoácidos– mediante la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)⁶.

Por tanto, inicialmente el número de patologías que se cribaban en niños recién nacidos estaba limitado a unas pocas enfer-

medades, como la fenilcetonuria, hiperplasia suprarrenal, hipotiroidismo congénito, la fibrosis quística o la falta de biotinidasa. No obstante, tras la incorporación de la EM al cribado neonatal se pasó a un cribado ampliado, donde se detectan una gran cantidad de alteraciones metabólicas en las que, aunque individualmente presenten una prevalencia baja, la suma de todas ellas supone una incidencia elevada. Entre estas metabolopatías se incluyen: alteración en la oxidación de los ácidos grasos, acidurias orgánicas y alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos, mediante la detección de las correspondientes carnitinas, ácidos orgánicos y aminoácidos⁶.

Dentro este ámbito, por un lado, para la EM enfocada al cribado neonatal ampliado, en la que se hace un análisis de acilcarnitinas, aminoácidos y succinilacetona en sangre –mediante punción en el talón del niño– y un estudio de ácidos orgánicos en

orina seca –procedente del pañal de niño–, el espectrómetro de masas no se acopla a ninguna técnica cromatográfica, utilizando el ESI como fuente de ionizador; y por otro, para la determinación de ácidos orgánicos en orina líquida –como prueba confirmatoria de referencia de ácidos orgánicos, pudiendo usarse tanto para cribado neonatal como para pacientes sintomáticos o controles–, se usa la EM acoplada a un cromatógrafo de gases, esto es, *cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)*^{7,8}.

1.1.2.2. Microbiología clínica

1.1.2.2.1. Identificación de grupos microbianos

Durante las últimas décadas del siglo pasado, determinados progresos supusieron un gran avance en el campo de la microbiología clínica, como son las técnicas de enzimoinmunoanálisis y genética molecular. No obstante, ha sido durante la última década

cuando ha tenido lugar una gran evolución en esta área clínica; ha sido gracias a la EM⁹. Y a pesar de que la primera vez que se aplicó la EM con esta finalidad se remonta al año 1975, fue necesaria su evolución para llegar al MALDI-TOF de uso microbiológico actual². Esta técnica ha permitido avanzar en la identificación microbiana mediante la obtención de unos perfiles proteicos específicos de géneros, especies e incluso de cepas bacterianas o fúngicas, haciendo uso de grandes bases de datos correspondientes a aquellos patrones de proteínas. Aunque hoy en día sigue siendo necesario hacer cultivos, tinciones y pruebas bioquímicas, con esta técnica es posible reducir el tiempo necesario para esta identificación microbiana –incluso permitiendo que se puedan identificar directamente desde los frascos de hemocultivos positivos–¹⁰, pudiendo ser en ocasiones vital para el paciente, especialmente en casos de sepsis¹¹⁻¹⁴.

1.1.2.2.2. Resistencias microbianas

La EM no solo está avanzando en la identificación de microorganismos, sino también para poder distinguir cual de aquellas bacterias son resistentes a determinados antibióticos. Esta vía para detectar sensibilidades microbianas puede suponer una reducción considerable en el tiempo necesario para empezar a usar un tratamiento específico en un determinado paciente; por tanto, un acortamiento en el tiempo de aplicación del tratamiento empírico, menos específico. Haciendo uso de la metodología habitual del laboratorio de microbiología clínica se necesitaría un mínimo de 24 horas de incubación; sin embargo, con la EM –concretamente MALDI-TOF– este tiempo se reduciría considerablemente mediante la detección de los iones correspondientes, trazadores de esas resistencias¹⁵.

Existen varias *estrategias* para la detección de estas resistencias microbianas, a saber¹⁶:

- *Detección de la propia actividad responsable de esa resistencia*: En este caso, lo que se detecta es una variación en la masa del antibiótico modificado, esto es, inactivación por la actividad enzimática responsable de la resistencia; así por ejemplo, en el caso de los antibióticos beta-lactámicos, cuando hay resistencia a ellos se debe a una hidrólisis en la que se añade una molécula de agua a la estructura, por lo tanto, incrementando su masa, más concretamente, en 18 Dalton. Esta diferencia es identificada por la EM.
- *Detección del patrón proteico de las bacterias resistentes/sensibles*: Al igual que sucede para detectar y diferenciar géneros, especies o cepas microbianas, la estrategia para discriminar entre bacterias resistentes o sensibles a un deter-

minado antibiótico es la misma, esto es, identificar una serie de proteínas por MALDI-TOF que son características de las cepas resistentes. Esto es debido a que las resistencias tienen un origen nucleotídico, es decir, variación genética, lo que puede llevar a que se determinen proteínas diferentes, por consiguiente, sujetas a la detección por EM.

- *Comparación del patrón proteico en presencia o no del antibiótico:* Se evaluarían diferencias espectrales de sus masas, antes y después de incubar las bacterias con el antibiótico correspondiente: las bacterias resistentes no varían su perfil proteico; sin embargo, las bacterias sensibles sí.

1.1.2.2.3. Identificación de hongos

Al igual que para las bacterias, también se han desarrollado metodologías para su identificación por EM, de nuevo, con MALDI-TOF.

Para la identificación fúngica son necesarios estudios morfológicos, bioquímicos o enzimáticos, que en el caso de hongos miceliales pueden llevar incluso algunas semanas. El desarrollo en los últimos años de técnicas de biología molecular, mediante el estudio del ADN ribosomal, ha permitido la identificación de algunos tipos de hongos de una manera rápida y eficiente. No obstante, estas técnicas moleculares presentan el inconveniente de ser caras y de difícil implantación en un laboratorio de rutina^{17,18}. De ahí que la irrupción del espectrómetro de masas, en la identificación fúngica de especies relevantes clínicamente, suponga una potencial herramienta de rutina en los laboratorios de microbiología clínica para este tipo de patógenos^{5,19}.

1.1.2.2.4. Identificación de micobacterias

Debido a la elevada incidencia de infecciones por micobacterias, como puede

ser *Mycobacterium tuberculosis* o micobacterias no tuberculosas, es preciso poder identificarlas de manera correcta y rápida. Actualmente, debido a las particularidades que presentan respecto de otras bacterias, los métodos de identificación son laboriosos y deficientes, y de nuevo, la biología molecular tiene limitado su uso; una vez más, la EM supone una herramienta con la que poder identificar incluso cepas dentro de la especie *M. tuberculosis*^{2,20,21}.

1.1.2.3. Análisis de elementos traza en muestras clínicas

En el laboratorio clínico se hacen determinaciones de algunos elementos de la tabla periódica, como es el cinc o el cobre, debido a la importancia que presentan en la fisiología humana; siendo necesario para evaluar tanto déficits como excesos, que pueden llevar al desarrollo de enfermedades. En la actualidad, la metodología más

extendida para estas determinaciones es la espectrometría de absorción atómica; no obstante, al igual que en otras áreas, la EM está irrumpiendo también en este campo del laboratorio clínico. En este caso, el sistema de ionización es diferente a los comentados hasta ahora: el espectrómetro de masas en la determinación de elementos traza y metales utiliza la inducción acoplada de plasma (ICP). Este ionizador tiene como objeto nebulizar y deshidratar la muestra, romper la estructura molecular y, finalmente, excitar los átomos e ionizarlos; posteriormente, los iones pasarían al filtro de masas, siendo identificados en función de su relación m/z ^{22,23}.

1.1.2.4. Detección de enfermedades lisosomales

Las enfermedades lisosomales implican el déficit o ausencia de determinadas enzimas que están implicadas en la digestión

de diversos sustratos, como pueden ser los mucopolisacáridos. Son enfermedades con herencia autosómica recesiva, salvo la enfermedad de Fabry y Hunter que presentan una herencia recesiva ligada al cromosoma X. La no degradación de estos sustratos puede llevar a una determinada clínica, debido al acúmulo de sustancias tóxicas o déficit de otras –al igual que el resto de trastornos metabólicos hereditarios–, pudiendo dañar tejidos u órganos. Entre las manifestaciones clínicas, debido a su gravedad, son especialmente importantes las alteraciones neurológicas²⁴⁻²⁷. La incidencia de estas alteraciones no es muy elevada y en muchos casos no hay tratamiento efectivo; no obstante, globalmente suponen una cifra importante –como en el resto de metabopatías–. La prevalencia en Europa se encontraría en los 12-25 casos por cada 100.000 recién nacidos²⁴.

Además, últimamente se están abriendo posibilidades terapéuticas mediante la terapia génica, sustitución enzimática o trasplante de células hematopoyéticas^{24-26,28}. Entre las *enfermedades lisosomales susceptibles de estas terapias* se encuentran: las enfermedades de Niemann-Pick, Gaucher, Pompe, Krabbe, Fabry y las mucopolisacaridosis de los tipos I, II y VI^{24,27}. De ahí que la EM también se esté empezando a implementar en los laboratorios con esta finalidad, concretamente para formar parte del cribado neonatal²⁹. Un ejemplo del interés en detectar este tipo de patologías lo encontramos en el proyecto FIND, encargado de detectar y diagnosticar en niños de España mucopolisacaridosis mediante cribado selectivo; en este caso, la estrategia sería determinar por EM el producto formado, previa reacción resultante de poner en contacto las enzimas procedentes de la sangre seca del cartón junto con su sustrato específico²⁸.

1.1.2.5. Proteómica-metabolómica

Por lo general, cuando una función biológica se ve afectada por un determinado factor, no hay una sola molécula afectada, ya que los sistemas biológicos están formados por interacciones muy complejas, de manera que como reflejo de aquella disfunción se van a ver modificadas una gran variedad de proteínas y metabolitos, sujetos de estudio por la proteómica y metabolómica, respectivamente. Además, estas ciencias nos van a ofrecer una información más estrechamente relacionada con el fenotipo de una determinada patología que el estudio genómico, debido a que a medida que avanzamos en los mecanismos de regulación (genoma > transcriptoma > proteoma > metaboloma), encontraremos moléculas más específicas de una determinada situación fisiopatológica. Por tanto, la visión *ómica* posibilita un enfoque más global mediante el estudio

combinado de aquellas moléculas, de forma que nos pueden ofrecer un perfil diferencial más preciso respecto de aquellos procesos fisiopatológicos. Y en este sentido, la EM es una herramienta importante para esta finalidad; generalmente, se suele utilizar una separación previa de aquellas moléculas mediante cromatografía líquida (CL), combinando ambas técnicas (CL-EM). Una de las aplicaciones de estas ciencias se centra en el estudio de la enfermedad cardiovascular, para la obtención de un perfil de proteínas y metabolitos que indiquen ciertas situaciones de cardiopatía; también para el estudio de enfermedades intestinales^{4,30}.

1.1.2.6. Cuantificación de testosterona

En la actualidad, se hacen determinaciones de testosterona de manera rutinaria en los laboratorios clínicos, con fines diagnósticos o seguimiento de pacientes con diversos trastornos. En hombres, se suele

usar para detectar hipogonadismos o seguimiento de los niveles en pacientes con cáncer de próstata sometidos a castración; en mujeres, en la evaluación del estado de hiperandrogenismo, bajo determinadas manifestaciones clínicas, para descartar la presencia de tumores ováricos; y en niños, en ciertos casos, para asignación de género o, en adolescentes, en casos de alteraciones en el desarrollo puberal^{31,32}.

Para estas determinaciones se empezó usando el radioinmunoanálisis (RIA), aunque en la actualidad ha sido desplazada por las técnicas de inmunoanálisis, más adaptadas a la rutina de un laboratorio clínico, entre las que destacan: electroquimioluminiscencia, quimioluminiscencia o enzimoanálisis. Sin embargo, algunos estudios evidencian limitaciones de estas técnicas cuando se evalúan concentraciones bajas de testosterona; de nuevo la EM también se extiende a esta área clínica, ya

que podría ofrecer una mayor precisión a esos bajos niveles hormonales^{31,32}.

1.1.2.7. Monitorización de fármacos

Dentro de la monitorización de fármacos, el control de un tratamiento antimicrobiano es esencial, ya que una disminución en la concentración por debajo de la concentración mínima inhibitoria puede suponer el fracaso en el tratamiento y, en consecuencia, un riesgo para la salud del paciente, especialmente en aquellos con sepsis en estado crítico. La necesidad de llevar a cabo esta monitorización se justifica porque la farmacocinética correspondiente a determinados antibióticos va a variar dependiendo del paciente y su situación patológica particular. En estos casos, la EM acoplada a cromatografía líquida de ultra alta resolución podría ser una herramienta interesante en la rutina diaria del laboratorio clínico, según algunos estudios publicados^{33,34}.

También se está empezando a introducir esta tecnología para la monitorización de antipsicóticos –en este caso mediante CG-EM– ya que, al igual que para el seguimiento de antibióticos, es de gran importancia debido a las variaciones en la dinámica de los fármacos a nivel individual, así como por las interacciones que puedan generarse con otros antipsicóticos³⁵.

1.1.2.8. Detección y cuantificación de tóxicos

También en este campo es de gran utilidad la tecnología de EM, ya que permite detectar concentraciones muy bajas de tóxicos. La CG-EM se está utilizando para algunas intoxicaciones como es el caso de la detección y cuantificación de escopolamina, una droga altamente tóxica que presenta actividad antimuscarínica³⁶.

1.1.2.9. Detección de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La EPOC es una enfermedad respiratoria en la que hay una limitación del flujo aéreo, es crónica y progresiva. Uno de los factores de riesgo más importantes es el tabaco; este genera un número elevado de especies reactivas del oxígeno y cuantiosos radicales libres que conducen a un estrés oxidativo a nivel pulmonar, lo que implica la generación de ácidos orgánicos volátiles^{37,38}.

La prueba de referencia es la espirometría; sin embargo, debido a la alta mortalidad que exhibe esta patología –más de 2,9 millones de muertes al año, según la Organización Mundial de la Salud– y al alto grado de infradiagnóstico –según estudio epidemiológico en España un 73% de personas confirmadas carecían de historial EPOC–, la EM podría contribuir a la detección de este tipo de pacientes, diferenciándolos de los

sujetos sanos, mediante la identificación de aquellos ácidos orgánicos volátiles. En esta línea hay avances que tratan de encontrar algunos que puedan funcionar como biomarcadores EPOC^{37,38}.

1.1.3. Justificación

Cada vez hay un mayor conocimiento y tratamiento de las enfermedades que afectan a la especie humana, gracias al gran desarrollo que se está experimentando en los últimos años tanto en la investigación de las patologías a nivel molecular, lo que lleva a la identificación de analitos característicos, como en los avances en el desarrollo de terapias para estas enfermedades. De forma paralela, y como eslabón de los avances anteriores, también han tenido lugar una serie de desarrollos tecnológicos destinados a la detección y diagnóstico de estados patológicos, a partir de muestras obtenidas de for-

ma poco invasiva y mediante un procesado rápido. Un protagonista importante de estos progresos ha sido la EM en este ámbito clínico, ya que presenta un gran potencial tanto desde el punto de vista analítico como clínico. De ahí que se pretenda saber el alcance práctico de esta tecnología en los laboratorios clínicos.



Formación Alcalá