



Universidad
Rey Juan Carlos

GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2022/23
Trabajo de Fin de Grado

**ESTUDIO ACUAFOTÓMICO EN INFRARROJO CERCANO DE LA
ESTRUCTURA DEL AGUA EN MUESTRAS DE SUERO DE
PACIENTES CON HEPATITIS C**

Autor: Alba del Valle Reigosa

Directores: Myriam Catalá Rodríguez, José Gómez Sánchez
Tutor URJC: Myriam Catalá Rodríguez

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Resumen..... | 3 |
| 2. Introducción | 3 |
| 3. Materiales y métodos | 6 |
| 3.1. <i>Cohorte de pacientes y recolección de muestras</i> | 6 |
| 3.2. <i>Procesamiento y análisis de datos</i> | 6 |
| 3.2.1. <i>Espectro de sustracción</i> | 7 |
| 3.2.2. <i>Acuafotómica</i> | 7 |
| 4. Resultados | 7 |
| 4.1. <i>Huella metabolómica de los pacientes con hepatitis C</i> | 7 |
| 4.2. <i>Análisis de las Componentes Principales</i> | 8 |
| 4.3. <i>Perfil NIRS de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C</i> | 10 |
| 4.4. <i>Acuafotómica</i> | 14 |
| 5. Discusión..... | 15 |
| 6. Conclusiones | 17 |
| 7. Futuras líneas de investigación | 17 |
| 8. Agradecimientos | 17 |
| 9. Bibliografía | 17 |

1. Resumen

La ausencia de vacuna para el virus de la hepatitis C hace que el diagnóstico precoz desempeñe un papel importante para frenar la transmisión del virus, así como para reducir la mortalidad de los pacientes. Los métodos de diagnóstico de esta patología están basados en las pruebas serológicas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas pruebas a pesar de su gran fiabilidad y precisión, el tiempo de espera para la obtención del resultado es largo. La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica precisa, rápida y de menor coste que es especialmente potencial en campos como la biomedicina. La acuafotónica es una disciplina científica que estudia el comportamiento de la molécula de agua, especialmente en sistemas biológicos donde el agua es el principal componente. En estudios recientes se han identificado las principales bandas de absorción del agua en la región comprendida entre los 1300-1600 nm. Estas bandas de absorción, denominadas WAMACS (Water Matrix Absorbance Coordinantes) se corresponden con determinadas especies de agua y son sensibles a pequeños cambios físico- químicos que se produzcan en el sistema. En estudios del espectro NIR de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C en la región 1000-2500 nm, se demuestra que la molécula de agua oculta las absorbancias de los grupos funcionales presentes en la solución y es el principal componente en el espectro NIR de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C en el rango de los 1300 a 1700 nm. Por ello, el principal objetivo de este trabajo es la realización de un estudio acuafotómico de los principales WAMACS identificados en el espectro NIR de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C en la región de los 1300 a 1700 nm. En primer lugar, se analizó el espectro NIR de pacientes con hepatitis C, algunos de ellos positivos en PCR y otros negativos en PCR. A continuación, se realizaron análisis matemáticos y estadísticos para la visualización de las diferencias en las bandas de absorción de los espectros positivos y negativos en HCV. En los estudios del espectro medio NIR y en el análisis de las componentes principales se observaron diferencias entre ambos espectros y, por otro lado, en el PCA loading, espectro de sustracción y la segunda derivada los principales WAMACS fueron detectados. El acuagrama muestra diferencias significativas en los patrones de absorción del agua en los WAMACS C7, C9 y C11. Los resultados de este estudio complementan a otros estudios acuafotómicos realizados en enfermedades como la diabetes y en el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) que detectan diferencias en los WAMACS C7, C9 y C11.

Palabras clave: Hepatitis C, NIRS, WAMACS, acuafotónica.

2. Introducción

La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) es una enfermedad de transmisión sanguínea que afecta a la salud mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 58 millones de personas padecen infección crónica de HCV y supone un coste de miles de millones de dólares en atención médica anualmente (Manickam, Reeves et al., 2014).

La situación se ha visto agravada estos últimos años, ya que la pandemia causada por la COVID-19 ha provocado que muchas investigaciones clínicas y procedimientos médicos hayan sido pospuestos de modo que el acceso al diagnóstico y tratamiento es escaso (Kondili, et al., 2020). Por otro lado, el riesgo de transmisión de la infección se ve acentuado por la ausencia de vacuna, por ello la prevención y el diagnóstico precoz desempeñan un papel fundamental para frenar su transmisión, así como para su posible tratamiento.

Las principales técnicas de diagnóstico empleadas para la detección de enfermedades de transmisión sanguínea y sexual, como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la hepatitis B (HBV) y la hepatitis C (HCV), son las pruebas serológicas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sakudo, et al., 2005). Ambas pruebas han sido utilizadas para el diagnóstico de enfermedades transmitidas por virus debido a su fiabilidad y precisión. Sin embargo, estas técnicas son caras y el tiempo de espera para la obtención del resultado de la prueba es largo. De esta forma, se requiere el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico sensibles, precisas, rápidas y de menor coste (Sakudo, et al., 2005).

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica que permite medir la absorción de la luz infrarroja por parte de la materia orgánica en el rango del espectro que comprende los 750 y los 2500 nm. El espectro resultante está relacionado con la absorción de las formas vibracionales de los grupos funcionales, así como los compuestos aromáticos, alifáticos, carboxilos y las aminas y las amidas que son los principales componentes de la materia orgánica (Xiaobo, et al., 2010). La espectroscopía NIRS permite a su vez detectar estos compuestos facilitando la visualización de cambios en los patrones de absorción de estos en las muestras.

El uso de la espectroscopía NIRS se ha visto incrementada durante los últimos años, especialmente en el ámbito de la biomedicina y se ha empleado para la detección de diversas patologías tales como Alzheimer, carcinomas cutáneos, lepra, diabetes, cáncer de mama y colorrectal y síndrome de fatiga crónica (Paraskevaidi, et al., 2018). Se trata de una técnica en la que no se produce destrucción de la muestra y permite obtener el resultado del análisis con una mayor rapidez. Además, la espectroscopía NIRS no requiere el uso de reactivos y es un método de menor coste (Sakudo, et al., 2005). Asimismo, es una técnica de fácil manejo (Murayama, et al., 1998). Sin embargo, esta técnica presenta dificultades en el procesamiento y tratamiento de los datos, por esta razón se requiere una gran demanda computacional. Además, la interpretación de los espectros puede ser compleja ya que el solapamiento de las bandas de absorción de los diferentes grupos funcionales dificulta la asignación de los picos de absorción a cada grupo funcional.

La interacción entre el agua y la luz proporciona información acerca del comportamiento de la molécula del agua con las biomoléculas de su entorno (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). Como resultado de esa interacción en el espectro NIRS resultante se reflejan los picos de absorbancia del agua con diferente intensidad y frecuencia, en forma de un patrón de bandas de absorción del agua (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). Los WAMACS son ciertas regiones del espectro donde las bandas de absorción están asociadas a una especie de agua determinada (Tsenkova, R., et al., 2018). Se han hallado 12 WAMACS en la región del espectro NIR comprendida entre los 1300-1600 nm (Tsenkova, R., et al., 2018) (Figura 1). Este patrón de bandas de absorción se ve afectado por ligeros cambios físico-químicos que se produzcan en el sistema, que alteran la conformación de los enlaces que la molécula de agua adopta con los principales grupos funcionales presentes en la solución (Tsenkova, 2009).

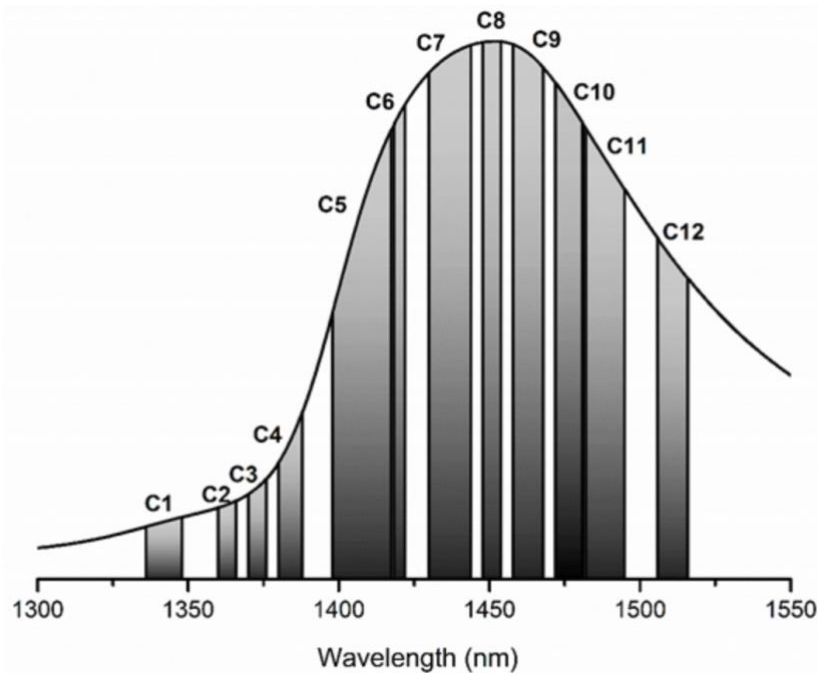


Figura 1. Principales WAMACS presentes en la región NIR (1300-1600 nm). Muncan, J., & Tsenkova, R. (2019).

El agua es uno de los principales componentes que están presentes en las células humanas y es fundamental para la formación de las estructuras de algunas biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos). Muchos de los estudios que se han realizado para la detección de patologías, han focalizado el estudio en el análisis de una determinada molécula y en la que el agua es considerada un impedimento en el análisis de las muestras.

La acuafotómica es una disciplina científica basada en el estudio del agua como un biomarcador que aporta información acerca del estado del sistema (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). La molécula de agua forma enlaces de hidrógeno con el resto de las moléculas conformando un complejo sistema molecular (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). Estos enlaces que el agua establece entre las propias moléculas de agua y/o con otras biomoléculas son muy sensibles a los cambios fisicoquímicos producidos en el propio sistema o en su entorno. Debido a este fenómeno, los pequeños cambios que se produzcan en la solución hacen que la estructura de los enlaces de las moléculas de agua sea modificada (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). De este modo, es posible detectar cambios en los patrones de absorción del agua en el espectro NIR que resultan útiles para el diagnóstico de una enfermedad (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019).

Recientemente, la Universidad Rey Juan Carlos de Móstoles (Madrid, España) llevó a cabo un estudio en el que se hicieron mediciones espectrales, mediante el empleo de la técnica NIRS, de sueros de pacientes con HCV, algunos positivos y otros negativos mediante PCR. (Gonzalo et al., 2021) concluyen que la molécula de agua oculta la absorbancia de los grupos funcionales presentes en la muestra de pacientes con HCV y es la molécula que más picos de absorbancia presenta en el rango de los 1000 a 2500 nm. Esto supondría un avance importante en la investigación clínica, ya que es posible determinar posibles diferencias en la acuafotómica de las muestras de suero de pacientes positivos. De este modo, es necesario el desarrollo de un estudio acuafotómico utilizando la espectroscopía NIRS, que permita proporcionar avances en el diagnóstico precoz de esta enfermedad.

Las muestras de suero de los pacientes contienen HCV. Sin embargo, hay pacientes que son positivos en HCV mediante PCR y otros no. Los sueros de pacientes positivos en HCV presentan diferencias respecto a los sueros de pacientes negativos en HCV debido a las diferencias en la concentración de los analitos. Las diferencias en la composición de los sueros pueden influir en los enlaces que el agua establece con las biomoléculas. De este modo es posible observar diferencias en los patrones de absorción del agua en el rango de los 1300 a 1700 nm mediante el uso de la espectroscopía NIR.

El objetivo general de este estudio es la elaboración de un modelo riguroso y rápido para el diagnóstico de la hepatitis C. Por ello los objetivos específicos son: (1) Identificación de los principales WAMACS del espectro NIRS de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C en el rango de los 1300 a 1700 nm. (2) Realización de un estudio acuafofotómico de los WAMACS más significativos del espectro NIRS de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C.

3. Materiales y métodos

3.1. Cohorte de pacientes y recolección de muestras

Las muestras de suero de pacientes anónimos con hepatitis C y fueron donadas 4 muestras de cada paciente en un periodo de tiempo comprendido entre los 2000 hasta 2010.

En el estudio de Gonzalo et al., (2021) se midió el espectro NIRS de 151 muestras de suero de pacientes con hepatitis C en el rango de los 1000 a 2500 nm. Los espectros fueron obtenidos mediante el espectrofotómetro Spectrum 100 N (Perkin Elmer, modelo precisely; Beaconfield; U.K.) y el software Spectrum (versión 6.3.4). La resolución espectral utilizada fue de 8 cm^{-1} ($8 \times 10^{-7} \text{ nm}$) y 64 escaneos. Además, se optimizaron las condiciones óptimas para el análisis de las muestras de suero a 37°C y con un volumen de $70 \mu\text{l}$.

En este estudio fueron analizadas 132 muestras de suero, de las cuales 57 muestras pertenecían a pacientes con niveles detectables de HCV y 75 muestras pertenecían a pacientes con niveles no detectables de HCV. Se midieron 800 espectros NIR de cada muestra de suero, en longitudes de onda comprendidas entre los 1300 y 1700 nm en intervalos de 0,5 nm.

3.2. Procesamiento y análisis de datos

Una vez recogidos los datos espectrales, estos fueron tratados y analizados estadísticamente mediante el programa R (versión 4.2.3). En primer lugar, se obtuvieron los espectros crudos de los sueros de pacientes con HCV. A continuación, se normalizó y se aplicó una corrección de señal multiplicativa extendida (MSC) a los espectros de pacientes positivos en HCV y a los espectros de pacientes negativos en HCV por separado. Además, se suavizaron los espectros aplicando el suavizado de Savitzky-Golay de 15 puntos para disminuir el ruido.

Una vez obtenidos los espectros suavizados que previamente han sido normalizados y tratados con MSC, se calculó el espectro medio de las muestras de suero de pacientes con HCV. Seguidamente, se calculó la segunda derivada de Savitzky-Golay aplicando un polinomio de grado 3 y 15 puntos, para la identificación de los picos de absorción del agua ocultos en el espectro crudo.

Para la reducción de la dimensionalidad de los datos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) que permite extraer patrones de información útil en los datos y facilita la visualización de la estructura de estos. Además, se extrajeron las loading del PCA para observar la importancia de las longitudes de onda encargadas de la construcción del PCA.

3.2.1. Espectro de sustracción

Por otro lado, para la obtención del espectro de sustracción, se empleó el espectro medio de sueros de pacientes con HCV que previamente fue tratado con MSC. El espectro de sustracción obtenido fue resultado de la sustracción del espectro medio de sueros de pacientes con niveles detectables de HCV del espectro medio de sueros de pacientes con niveles no detectables de HCV. Una vez obtenido el espectro de sustracción, se le aplicó el suavizado de Savitzky-Golay empleando un polinomio de grado 3 y 15 puntos. Seguidamente, se identificaron los picos de absorción del agua más importantes y mediante la consulta de tablas y bibliografía se asignaron a las especies de agua a las que pertenecen.

3.2.2. Acuafofotómica

Los picos de absorción que presentaron más relevancia en los PCA loading, en la segunda derivada y en el espectro de sustracción fueron utilizados para el estudio acuafofotómico. El análisis acuafofotómico se realizó a partir del espectro NIR medio pretratado de sueros de pacientes con hepatitis C en el rango de los 1300 a 1700 nm. Las absorbancias de cada pico fueron calculadas a partir del espectro medio NIR de la segunda derivada de pacientes positivos y negativos en HCV para conocer las contribuciones de cada especie de agua en cada uno de los espectros. Mediante la realización de un test estadístico se evaluaron las significancias estadísticas de las absorbancias de ambos grupos.

4. Resultados

4.1. Huella metabólica de los pacientes con hepatitis C

En el estudio de Gonzalo et al., 2021 se estudia el espectro medio de las muestras de suero de pacientes con HCV en el rango espectral de los 1000 a 2500 nm. Gonzalo et al., 2021 detectaron picos de absorción del agua en la región de los 1300 a 1700 nm donde se encuentran los principales WAMACS.

La huella metabólica de pacientes con hepatitis C es estudiada a partir del espectro medio NIR de las muestras de suero de pacientes con HCV en el rango espectral de los 1300 a 1700 nm (Figura 2). La principal diferencia entre ambos espectros, es que el espectro de sueros de pacientes negativos en HCV presenta mayor absorbancia que el espectro de suero de pacientes positivos en HCV.

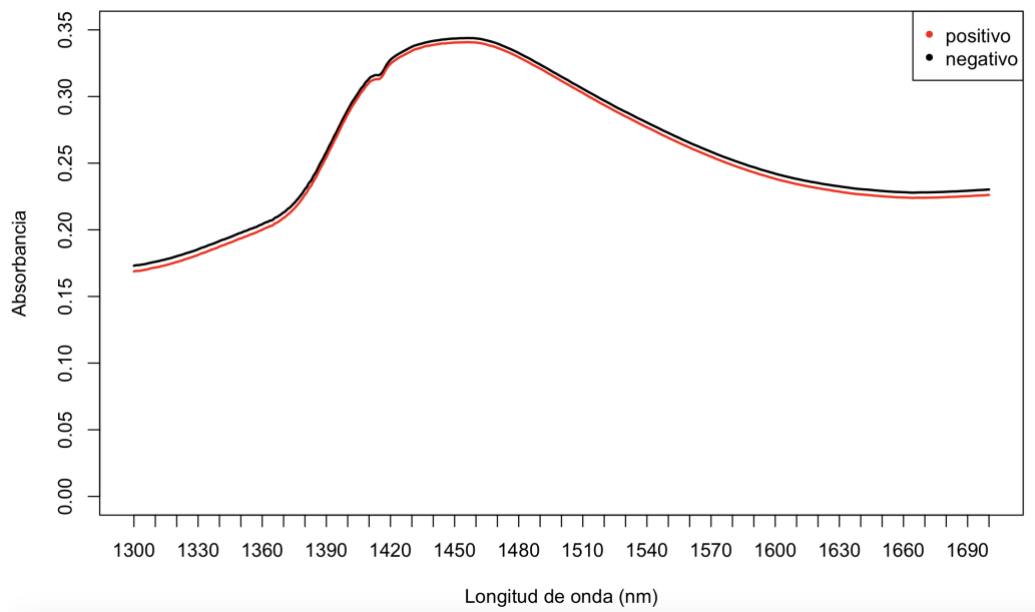


Figura 2. Espectro medio NIR con MSC, normalizado y suavizado de Savitzky-Golay ($n=15$) del suero pacientes positivos (línea roja) y negativos en HCV (línea negra).

El análisis de los datos espectrales implica dificultades en la extracción de información útil debido a factores no deseados en las mediciones. El tratamiento con MSC de los datos espectrales permite corregir el espectro cuando presenta variaciones como resultado de la variación aditiva debido a la dispersión de las muestras (Tsenkova, R., et al., 2018).

4.2. Análisis de las Componentes Principales

El PCA fue aplicado como método para reducir la dimensionalidad de los datos. De este modo, es posible detectar patrones y extraer información relevante para visualizar de una forma más clara la estructura de los datos espectrales. El PCA fue aplicado después del pretratamiento con MSC de los espectros NIR crudos de las muestras de suero de pacientes con HCV.

En la Figura 3 están representadas PC1 y PC2 que, en conjunto, explican un 79,97% de la varianza. La componente principal 1 es la principal responsable de la separación entre grupos. Se observa que los grupos muestrales se separan de forma clara. Las absorbancias de los sueros de pacientes negativos en HCV se sitúan en regiones que alcanzan valores positivos y las absorbancias de los pacientes positivos en HCV se sitúan en las regiones con valores negativos.

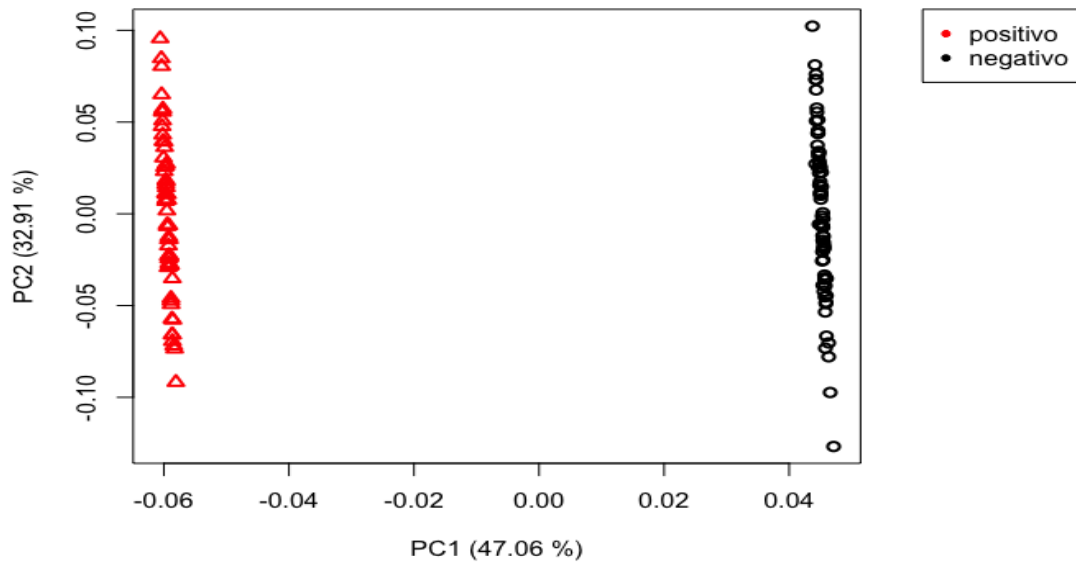


Figura 3. PCA del espectro NIR de pacientes positivos y negativos en HCV después del pretratamiento del espectro con MSC.

En relación con la Figura 4, ofrece una información acerca de los picos que presentan una significancia mayor en relación con la separación de los grupos ofrecida por PC1 tal y como se muestra en la Figura 3. Fueron seleccionados aquellos picos de absorción que presentaban una máxima contribución positiva en este loading. Son identificados en picos importantes a 1321, 1429, 1467, 1486 y 1669 nm asignados a la especie de agua a la que pertenecen en la Tabla 1. Ciertos picos no han sido asignados a la banda de absorción del agua ya que no se han encontrado referencias bibliográficas.

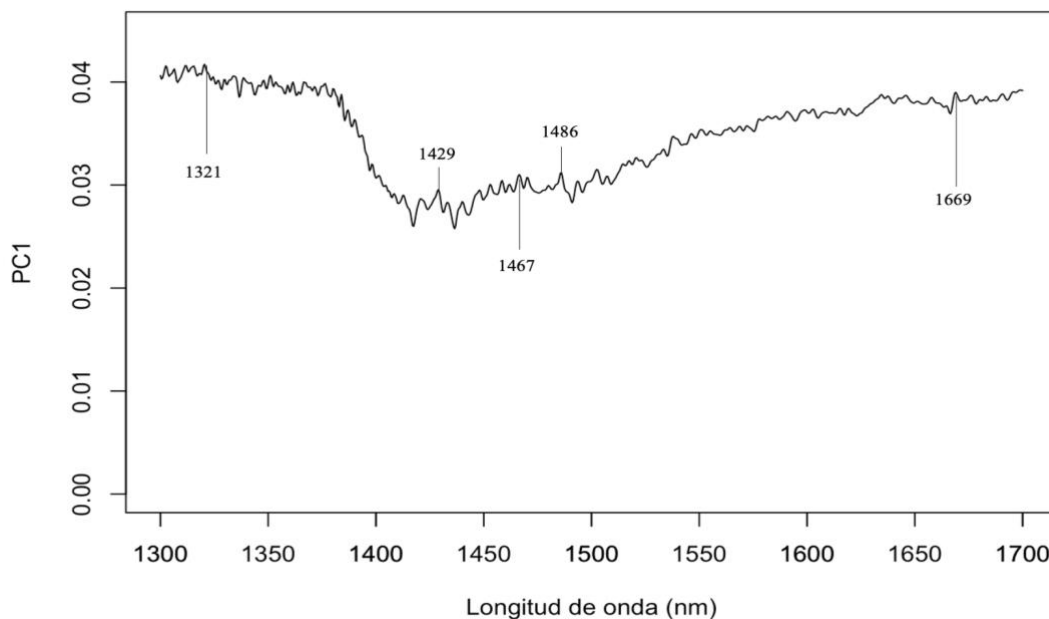


Figura 4. Perfil de los PCA loading de la PC1.

Tabla 1. Picos de absorción de la segunda derivada más significativos en la banda de absorción del agua en la región del segundo sobretono

| Longitud de onda (nm) | WAMACS | Asignación | Bibliografía |
|-----------------------|--------|---|--|
| 1321 | - | ν_3 , estiramiento asimétrico del agua | (Li et al., 2020) |
| 1429 | C7 | S_1 : Moléculas de agua con un enlace de hidrógeno | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1467 | C9 | S_2 : Moléculas de agua con 2 enlaces de hidrógeno $2\nu_2 + \nu_3$: H ₂ O doblado y vibración de extensión asimétrica | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1486 | C11 | S_4 : Moléculas de agua con 4 enlaces de hidrógeno | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1669 | - | Urea – Tampón fosfato. (1626-1681 nm) | (Chen, J., et al., 2004) |

4.3. Perfil NIRS de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C

El espectro de substracción resultante fue calculado a partir de la substracción de las absorbancias del espectro medio de pacientes negativos de las absorbancias del espectro medio de pacientes positivos en HCV (Figura 5). En las regiones positivas del perfil NIRS de substracción, se identifican longitudes de onda a 1418,1437 y 1491 nm donde se observan mayores diferencias en las absorbancias medias de ambos espectros. En las regiones negativas son detectadas longitudes de onda a 1321,1351,1634 y 1669 nm. Las mayores diferencias en las absorbancias medias de ambos espectros se observan a 1321 y 1351 nm. Estos picos identificados se asignan a su banda de absorción del agua mediante la consulta de tablas y bibliografía como se refleja en la Tabla 2.

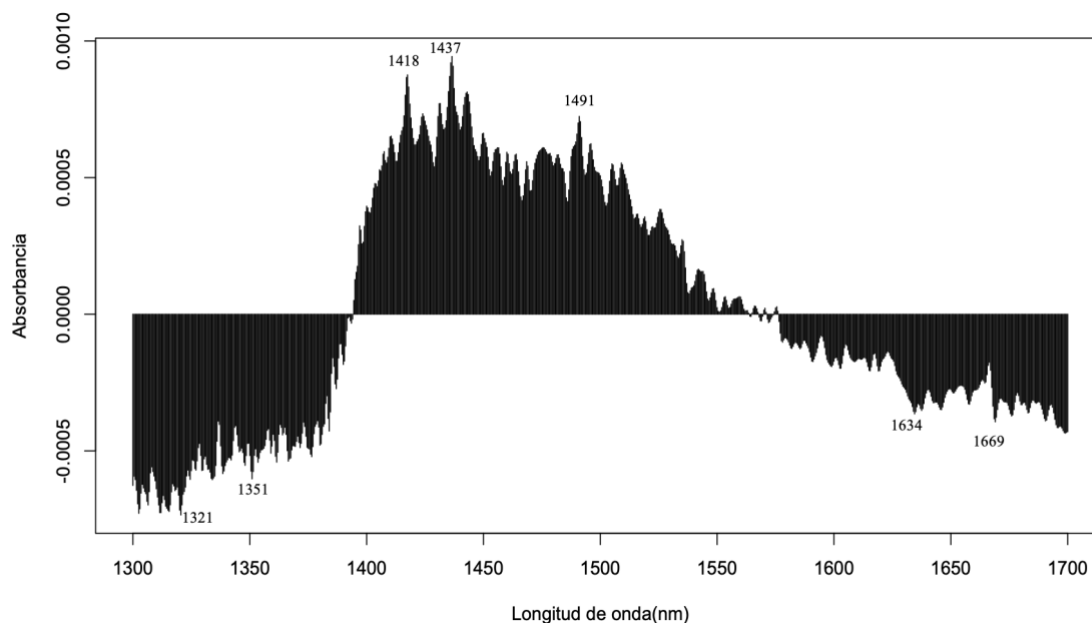


Figura 5. Perfil NIRS de las absorbancias medias de pacientes negativos de las absorbancias medias de pacientes negativos en HCV.

Tabla 2. Picos de absorción del espectro de sustracción más significativos en la banda de absorción del agua en la región del segundo sobretono

| Longitud de onda (nm) | WAMACS | Asignación | Bibliografía |
|-----------------------|--------|---|--|
| 1321 | - | v3, estiramiento asimétrico del agua | (Li et al., 2020) |
| 1351 | C1 | Vibración de extensión asimétrica del agua | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1418 | C6 | Banda de hidratación del agua. H-OH y O-H... O | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1437 | C7 | S ₁ : Moléculas de agua con un enlace de hidrógeno | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1491 | C11 | S ₄ : Moléculas de agua con 4 enlaces de hidrógeno | (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). |
| 1634 | - | Urea - Tampón fosfato. (1626-1681 nm). | (Chen, J., et al., 2004) |
| 1669 | - | | |

Una vez observadas las diferencias en ambos espectros mediante los análisis realizados anteriormente, se calcula la segunda derivada a partir del espectro medio de ambos grupos para visualizar los picos de absorción que quedan ocultos en el espectro sin pretratamiento. Los resultados de la segunda derivada de los espectros negativos y positivos en HCV (Figura 6). Los picos más distintivos son a 1437, 1443 y 1491 nm donde se encuentran diferencias en la intensidad de la absorbancia y han sido hallados exclusivamente en el espectro de pacientes positivos en HCV. Además, se encuentran picos que sólo han sido detectados en el espectro de pacientes negativos en HCV a 1502 nm.

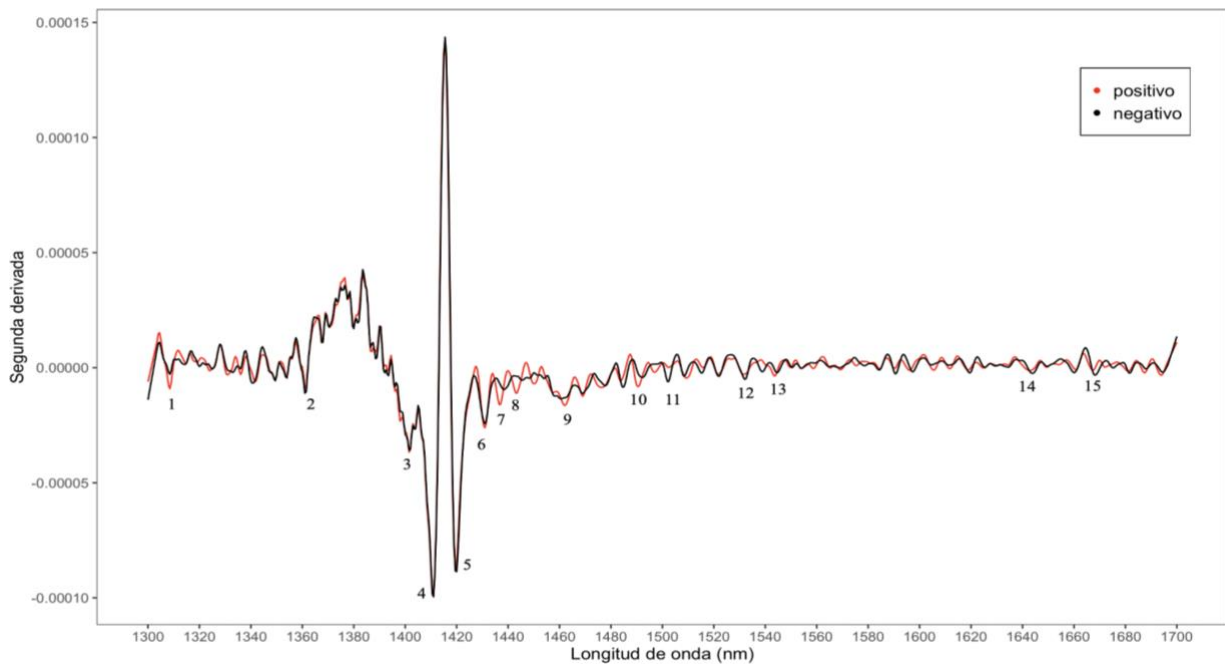


Figura 6. Segunda derivada de Savitzky-Golay de Orden 3 y 15 Puntos del espectro medio normalizado y su con MSC de pacientes con niveles detectables y no detectables de HCV.

Los picos de absorción más significativos son identificados y, mediante la consulta de tablas bibliográficas, cada pico es asignado a su banda de absorción del agua correspondiente como se muestra en la Tabla 3 (Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019). La mayoría de estos picos fueron asignados a la especie de agua a la que pertenecen mediante la bibliografía consultada. Sin embargo, de los picos 1309, 1532, 1545 nm no se encontraron referencias bibliográficas.

Tabla 3. Picos de absorción de la segunda derivada más significativos en la banda de absorción del agua en la región del segundo sobretono.

| N.º de pico | HCV + | HCV - | WAMACS | Asignación |
|-------------|-------|-------|--------|---|
| 1 | 1309 | 1309 | - | - |
| 2 | 1361 | 1361 | C2 | OH-(H ₂ O) _{1,2,3} Esfera de solvatación |
| 3 | 1402 | 1402 | C5 | Agua confinada en un campo local de iones. |
| 4 | 1411 | 1411 | | Agua libre. |
| 5 | 1420 | 1420 | C6 | Banda de hidratación del agua. H-OH y O-H... O |
| 6 | 1431 | 1431 | | |
| 7 | 1437 | - | C7 | S ₁ : Moléculas de agua con un enlace de hidrógeno |
| 8 | 1443 | - | | |
| | | | | S ₂ : Moléculas de agua con 2 enlaces de hidrógeno |
| 9 | 1461 | 1461 | C9 | 2ν ₂ + ν ₃ : H ₂ O doblado y vibración de extensión asimétrica |
| 10 | 1491 | - | C11 | S ₄ : Moléculas de agua con 4 enlaces de hidrógeno |
| 11 | - | 1502 | C12 | S ₄ : Moléculas de agua con 4 enlaces de hidrógeno |
| 12 | 1532 | 1532 | - | - |
| 13 | 1544 | 1545 | - | - |
| 14 | 1643 | 1644 | - | Urea - Tampón fosfato. (1626-1681 nm). |
| 15 | 1668 | 1668 | | |

4.4. Acuafotómica

El estudio acuafotómico fue realizado con las principales bandas de absorción identificadas en los análisis espectrales del PCA loading, espectro de substracción y de la segunda derivada. Mediante los resultados del estudio, fueron identificados diez picos de absorción y asignados a la especie de agua correspondiente gracias al estudio de Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019 (ver Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de las longitudes de onda de las diferentes especies de agua en muestras de suero de pacientes con HCV.

| Especies de agua | HCV + | HCV- |
|------------------|-------|------|
| S_r | 1361 | 1361 |
| S_0 | 1402 | 1402 |
| | 1411 | 1411 |
| S_1 | 1420 | 1420 |
| | 1431 | 1431 |
| | 1437 | - |
| | 1443 | - |
| S_2 | 1461 | 1461 |
| S_4 | 1491 | - |
| | - | 1502 |

Para estudiar la contribución de las especies de agua en cada pico de absorción, se calculan las absorbancias del espectro NIR de la segunda derivada. Para ello, el espectro medio de las muestras de suero de los pacientes positivos y negativos fue normalizado y corregido con MSC antes de calcular la segunda derivada.

Se observan diferencias en la contribución de las especies de agua en cada pico de absorción reflejado en la Figura 7. Los patrones de absorbancia en el acuagrama de pacientes positivos y negativos presentan diferencias. La intensidad de la absorbancia de los sueros en los pacientes negativos fue significativamente mayor en S_1 (1437 nm;1443nm), S_2 (1461 nm) y en S_4 (1491 nm) (Tabla 5).

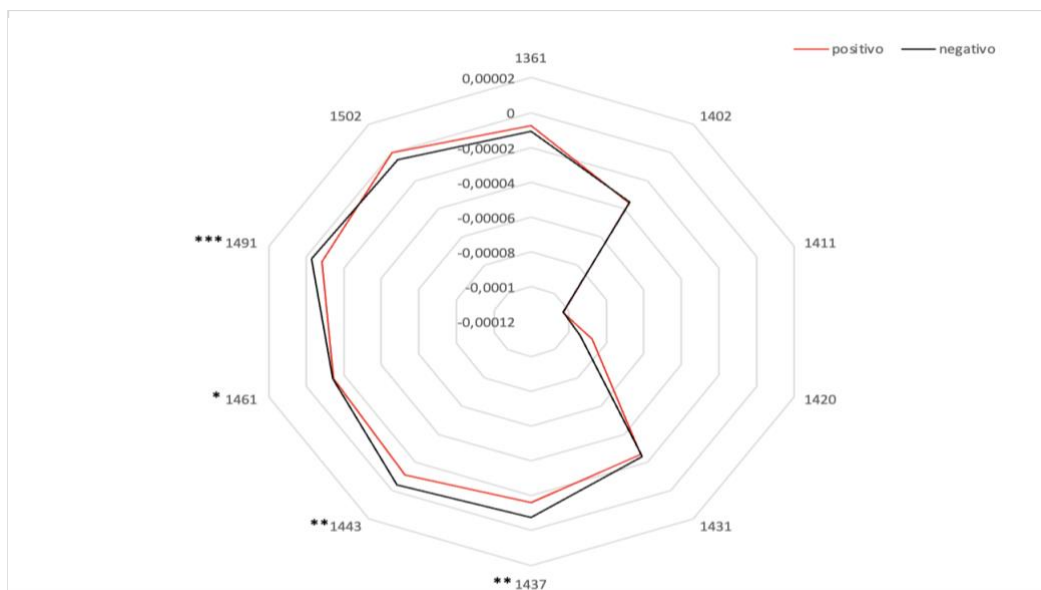


Figura 7. Acuagrama de las absorbancias del espectro NIR de la segunda derivada calculada a partir del espectro medio de pacientes con HCV pretratado con MSC de ambos espectros por separado en 10 picos de absorción del agua.

Tabla 5. Absorbancias con error estándar de las longitudes de onda de la segunda derivada.

| Longitud de onda | Absorbancias HCV + | Absorbancias HCV - | p-valor |
|------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| 1361 | -0,000008 ± 0,00002 | -0,00002 ± 0,00002 | 0,07 |
| 1402 | -0,00004 ± 0,00002 | -0,00005 ± 0,00002 | 0,5 |
| 1411 | -0,0001 ± 0,00003 | -0,0001 ± 0,00003 | 0,2 |
| 1420 | -0,0001 ± 0,00003 | -0,0001 ± 0,00003 | 0,2 |
| 1431 | -0,00003 ± 0,00002 | -0,00002 ± 0,00002 | 0,08 |
| 1437 | -0,00002 ± 0,00002 | -0,00001 ± 0,00002 | 0,002** |
| 1443 | -0,00001 ± 0,00002 | -0,000004 ± 0,00002 | 0,001** |
| 1461 | -0,00001 ± 0,00001 | -0,00001 ± 0,00001 | 0,1* |
| 1491 | -0,00001 ± 0,00002 | -0,000003 ± 0,00002 | 0,0001*** |
| 1502 | 0,0000001 ± 0,00002 | -0,000005 ± 0,00002 | 0,09 |

5. Discusión

Este es el primer estudio acuafotómico realizado con NIRS para estudiar los perfiles metabólicos de los pacientes con hepatitis C. El resultado del análisis del espectro NIR de pacientes con hepatitis C fue adquirido de forma rápida y sin la destrucción de las muestras de suero de los pacientes. En este estudio se realizaron diferentes análisis estadísticos y

matemáticos para estudiar posibles diferencias en el espectro NIR de las muestras de suero de pacientes HCV.

En el análisis del PCA se observaron diferencias en las absorbancias de los espectros de pacientes con niveles detectables y no detectables de HCV. La componente principal 1 es la que mayor varianza explicativa presentó (47,06%) y fue la responsable de la separación de ambos grupos muestrales. Las diferencias en el PCA demuestran la capacidad de la espectroscopia NIR de detectar pequeños cambios en la concentración de los analitos en las muestras como sucede en otros estudios. Sin embargo, el PCA no resulta un modelo predictivo, debido al tratamiento de los espectros con MSC por separado.

Se identificaron picos de absorción en los PCA loading, espectro de substracción y en la segunda derivada asociados a las principales especies de agua identificadas en el estudio de Muncan, J., Tsenkova, R. et al., 2019. La esfera de solvatación del agua fue hallada a 1361 nm. Se detecta agua libre a 1402 nm y 1411 nm. Fueron identificadas moléculas de agua con un enlace de hidrógeno (S_1) en 1431 nm, 1437 nm y en 1443 nm; moléculas con dos enlaces de hidrógeno (S_2) a 1461 nm y moléculas con 4 enlaces de hidrógeno (S_4) a 1491 nm y 1502 nm. En otros estudios se han hallado las mismas especies de agua en las mismas bandas de absorción del agua. Li et al., 2020 encuentra agua libre a 1408 nm y 1416nm y S_2 a 1462 nm en muestras de sangre de pacientes sanos y con diabetes. Muncan et al., 2016 analizan muestras de orina de pacientes para evaluar la eficacia de la diálisis en el síndrome urémico. Muncan et al. 2016 identifican la esfera de solvatación del agua (1364 nm), moléculas de agua libre (1410 nm), S_1 (1438 nm) y (1444 nm) y S_4 (1492 nm). Santos-Rivera, M., et al.,2022 detectan S_4 (1508nm) en muestras de condensado del aliento exhalado de los bovinos infectados por el virus respiratorio sincitial bovino.

La acuafotómica de los picos estudiados en el acuagrama indican la existencia de diferencias en el comportamiento de la molécula de agua en las absorbancias de la segunda derivada de los pacientes con HCV. Las diferencias en las absorbancias fueron estadísticamente significativas en las moléculas de agua con un enlace de H (S_1) 1431,1437 y 1443 nm; moléculas con dos enlaces de hidrógeno (S_2) 1461 nm y moléculas con cuatro enlaces de hidrógeno (S_4) a 1491 nm. Los sueros negativos presentaron un incremento en S_1 , S_2 y S_4 respecto a los sueros positivos. Del mismo modo, en otras situaciones patológicas como la diabetes, se detectan diferencias en los patrones de absorbancia del agua en muestras de sangre de pacientes sanos, prediabéticos y con diabetes (Li et al., 2020).En el estudio de Li et al., 2020 las absorbancias de las muestras de pacientes sanos presentan una mayor intensidad que los pacientes diabéticos en S_0 , mientras que en las moléculas con mayor número de enlaces de H los pacientes prediabéticos presentan mayor intensidad en las absorbancias que los pacientes sanos. Además, el estudio acuafotómico realizado permite observar el seguimiento de la enfermedad de los pacientes positivos y negativos en HCV. Muncan et al., 2016 realizan un seguimiento de la terapia de diálisis donde las muestras de urea de los pacientes presentan modificaciones en los patrones de absorbancia del agua. Las moléculas con más enlaces de H presentan mayor absorbancia a los 5 minutos de realizar la monitorización de diálisis.

Las principales diferencias en los patrones de absorción del agua fueron detectadas en los WAMACS C7, C9 y C11. En otros estudios acuafotómicos se han encontrado diferencias en los WAMACS C7, C9 y C11. En un estudio acuafotómico realizado para el diagnóstico del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), Santos-Rivera, M., et al.,2022 observan diferencias en los WAMACS C7 y C11 como consecuencia de la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que aumenta su concentración en las muestras de condensado del aliento exhalado de

los bovinos infectados. En el estudio de Li et al., 2020 se observa el progreso de la diabetes mediante cambios en los patrones de absorción en C5 y C9.

6. Conclusiones

La espectroscopía NIR es una técnica que mediante la interacción del agua con la luz permite detectar cambios fisicoquímicos en las muestras de suero de pacientes con niveles detectables y no detectables de HCV. Es una técnica de fácil manejo y permite la obtención del resultado del análisis con una gran rapidez. Además, es una técnica de menor coste y no requiere uso de reactivos. Sin embargo, resulta complejo el análisis, procesamiento y tratamiento de los datos espectrales.

El estudio acuafotómico mediante el uso de la espectroscopía NIRS demuestra la existencia de diferencias en los patrones de absorción del agua en los sueros de los pacientes positivos y negativos en las moléculas de agua con uno, dos y cuatro enlaces de H.

7. Futuras líneas de investigación

Se han hallado picos de absorción del agua en los análisis realizados del espectro NIR de las muestras de suero de pacientes con hepatitis C de los que no se encontraron referencias bibliográficas a 1309, 1532, 1544 nm. Sería interesante el estudio más exhaustivo de WAMACS en el rango de los 1300 - 1700 nm.

8. Agradecimientos

Este TFG ha sido resultado de meses de gran esfuerzo y aprendizaje. En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis tutores Myriam Catalá y José Gómez que me han transmitido su conocimiento y resuelto todas mis dudas. En segundo lugar, a mi familia y a Álvaro que siempre han creído en mí.

9. Bibliografía

Bruñas Gómez, I., Casale, M., Barreno, E., & Catalá, M. (2022). Near-infrared metabolomic fingerprinting study of lichen thalli and phycobionts in culture: Aquaphotomics of *Trebouxia lynnae* dehydration. *Microorganisms*, *10*(12), 2444.

Chen, J., Arnold, M. A., & Small, G. W. (2004). Comparison of combination and first overtone spectral regions for near-infrared calibration models for glucose and other biomolecules in aqueous solutions. *Analytical chemistry*, *76*(18), 5405-5413

Kondili, L. A., Marcellusi, A., Ryder, S., & Craxì, A. (2020). Will the COVID-19 pandemic affect HCV disease burden?. *Digestive and Liver Disease*, *52*(9), 947-949.

- Li, Y., Guo, L., Li, L., Yang, C., Guang, P., Huang, F., ... & Hu, J. (2020). Early diagnosis of type 2 diabetes based on near-infrared spectroscopy combined with machine learning and aquaphotomics. *Frontiers in Chemistry*, 8, 580489
- Manickam, C., & Reeves, R. K. (2014). Modeling HCV disease in animals: virology, immunology and pathogenesis of HCV and GBV-B infections. *Frontiers in microbiology*, 5, 690.
- Munćan, J., Mileusnić, I., Matović, V., Šakota Rosić, J., & Matija, L. (2016). The prospects of aquaphotomics in biomedical science and engineering. In *Aquaphotomics: Understanding Water in Biology—2nd International Symposium*. Kobe, Japan: Kobe University.
- Muncan, J., & Tsenkova, R. (2019). Aquaphotomics—From innovative knowledge to integrative platform in science and technology. *Molecules*, 24(15), 2742.
- Murayama, K., Yamada, K., Tsenkova, R., Wang, Y., & Ozaki, Y. (1998). Determination of human serum albumin and γ -globulin in a control serum solution by near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 362, 155-161.
- Paraskevaidi, M., Morais, C. L., Freitas, D. L., Lima, K. M., Mann, D. M., Allsop, D., ... & Martin, F. L. (2018). Blood-based near-infrared spectroscopy for the rapid low-cost detection of Alzheimer's disease. *Analyst*, 143(24), 5959-5964.
- Sakudo, A., Tsenkova, R., Onozuka, T., Morita, K., Li, S., Warachit, J., ... & Ikuta, K. (2005). A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiology and immunology*, 49(7), 695-701.
- Santos-Rivera, M., Woolums, A. R., Thoresen, M., Meyer, F., & Vance, C. K. (2022). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection detected in exhaled breath condensate of dairy calves by near-infrared aquaphotomics. *Molecules*, 27(2), 549.
- Tsenkova, R., Munćan, J., Pollner, B., & Kovacs, Z. (2018). Essentials of aquaphotomics and its chemometrics approaches. *Frontiers in chemistry*, 6, 363.