

5 Método para pronosticar nefritis lúpica a partir de espectroscopia Raman aumentada

Campo de la invención

- La presente invención pertenece al campo técnico de la bioquímica, la fisicoquímica, la espectroscopía aplicada al análisis de muestras biológicas y el procesamiento estadístico de señales espectrales. En particular, la invención se relaciona con un método para pronosticar nefritis lúpica a partir del análisis de muestras de orina mediante espectroscopía Raman aumentada, empleando nanopartículas de oro como sustrato de aumento de señal y modelos estadísticos de análisis discriminante para identificar señales asociadas a metabolitos urinarios.
- De manera más específica, la invención se refiere a un método no invasivo de análisis de muestras urinarias provenientes de pacientes con lupus, en el cual las muestras se mezclan con una solución de nanopartículas de oro y posteriormente se someten a espectroscopía Raman aumentada, generando espectros que son procesados mediante modelos de cuadrados mínimos parciales acoplados a análisis discriminante, con el fin de pronosticar la presencia de nefritis lúpica y, en una modalidad particular, identificar el estadio de dicha condición a partir de las intensidades relativas de señales Raman asociadas a metabolitos urinarios.

Estado de la técnica

- El lupus es una enfermedad autoinmunitaria crónica que presenta estadios de brote y remisión, y que puede afectar diferentes órganos del cuerpo. Una de sus manifestaciones clínicas de mayor importancia es el daño renal, conocido como nefritis lúpica. Las afectaciones renales asociadas al lupus pueden tener un inicio asintomático en una proporción significativa de pacientes, lo cual dificulta su caracterización temprana mediante las herramientas disponibles de análisis, pronóstico y seguimiento.

La identificación tardía de pacientes con lupus que pueden estar desarrollando nefritis lúpica representa un problema clínico relevante, debido a que la progresión del daño tisular renal puede conducir a complicaciones severas, incluyendo enfermedad renal terminal. En este contexto, existe la necesidad de contar con herramientas que permitan realizar una

5 detección o pronóstico temprano de la nefritis lúpica mediante técnicas capaces de revelar cambios moleculares asociados con el estado funcional del riñón.

Los distintos estados cualitativos de la nefritis lúpica se relacionan con cambios que ocurren a diferentes niveles, incluyendo alteraciones moleculares, celulares, tisulares y clínicas. Dichas alteraciones pueden ser detectadas mediante técnicas analíticas capaces de
10 identificar cambios en la composición molecular de muestras biológicas. Dentro de estas técnicas, la espectroscopía Raman permite detectar cambios en la composición molecular y celular de muestras biológicas, tales como la orina.

La orina constituye una muestra biológica de especial interés para el análisis de alteraciones renales, dado que es un producto de desecho generado por el cuerpo humano
15 a través de los riñones. En consecuencia, puede proporcionar información relacionada con la función renal y revelar la presencia de componentes o moléculas que puedan constituirse en biomarcadores pronósticos específicos en pacientes con nefritis lúpica.

Dentro de la tecnología anterior se identificó el documento US2017234874, relacionado con morfología visual integrada y expresión de proteína en células usando dispersión de luz de
20 resonancia. Dicho documento se refiere a la detección de firmas de biomarcadores celulares y a su integración mediante espectroscopía por dispersión de luz, particularmente mediante biomarcadores que interactúan con nanopartículas funcionalizadas para dicho propósito.

A diferencia de la tecnología anterior identificada, la presente invención no se limita a la
25 detección de biomarcadores celulares específicos mediante nanopartículas funcionalizadas para una interacción particular. La invención propuesta permite que metabolitos presentes en una muestra de orina interactúen con nanopartículas de oro, de manera que pueda obtenerse un perfil espectral más amplio de los componentes adheridos o asociados a dichas nanopartículas. Esta característica permite generar información espectral útil para el
30 pronóstico de nefritis lúpica, considerando que el lupus y sus manifestaciones renales son condiciones multifactoriales en las cuales puede verse afectado más de un perfil biológico.

Adicionalmente, el principio técnico de la invención permite la identificación de señales Raman asociadas a metabolitos urinarios, lo cual puede ser útil no solo para el pronóstico de nefritis lúpica en una modalidad preferida, sino también para la identificación de otros

- 5 metabolitos que puedan relacionarse con otras señales de enfermedad, siempre que dichos metabolitos sean detectables mediante el análisis espectral correspondiente.

Problema técnico

El problema técnico que aborda la presente invención consiste en la necesidad de disponer de un método no invasivo, rápido y eficaz para pronosticar nefritis lúpica en pacientes con lupus, mediante el análisis de muestras de orina y la identificación de señales espectrales asociadas a metabolitos urinarios.

Las herramientas disponibles para el análisis pronóstico y seguimiento de la nefritis lúpica pueden resultar tardías frente al inicio asintomático de la afectación renal. Por ello, se requiere una solución técnica que permita analizar muestras biológicas obtenidas de forma mínimamente invasiva o no invasiva, como la orina, y que permita identificar perfiles moleculares relacionados con la presencia o el estadio de la nefritis lúpica.

Solución técnica propuesta

La presente invención proporciona un método para pronosticar nefritis lúpica a partir de espectroscopía Raman aumentada, en el cual una muestra de orina es mezclada con una solución de nanopartículas de oro, obteniéndose posteriormente espectros Raman que son procesados mediante un modelo estadístico de cuadrados mínimos parciales acoplado a análisis discriminante.

La solución técnica se fundamenta en que las nanopartículas de oro permiten aumentar la señal Raman de los metabolitos presentes en la muestra de orina, facilitando la obtención de un perfil espectral útil para distinguir muestras asociadas a pacientes con nefritis lúpica. Los espectros obtenidos son sometidos a análisis estadístico mediante un modelo PLS-DA, el cual permite pronosticar la nefritis lúpica a partir de señales Raman específicas asociadas a metabolitos urinarios.

En una modalidad particular, el método permite además identificar el estadio de la nefritis lúpica con base en las intensidades relativas de los metabolitos detectados. Para ello se emplea un segundo modelo PLS-DA, configurado para pronosticar cualquiera de los siete estadios a partir del análisis de las señales del espectro específicas de los metabolitos.

- 5 Opcionalmente, los modelos PLS-DA pueden integrarse a un módulo de procesamiento de datos mediante inteligencia artificial, con el fin de automatizar el procesamiento de los espectros Raman y facilitar la generación del resultado pronóstico.

Ventajas de la invención

- 10 La invención presenta ventajas técnicas frente a las soluciones conocidas, debido a que permite el análisis de muestras de orina con una preparación mínima de muestra y sin invasión del paciente. Al emplear espectroscopía Raman aumentada con nanopartículas de oro, el método facilita la detección de señales asociadas a metabolitos urinarios que pueden relacionarse con la nefritis lúpica.

- 15 Otra ventaja de la invención consiste en que no se limita a la detección de un único biomarcador específico, sino que permite construir un perfil espectral más amplio de componentes presentes en la muestra de orina. Esto resulta particularmente relevante en enfermedades multifactoriales como el lupus, en las cuales la afectación renal puede involucrar múltiples alteraciones biológicas.

- 20 Asimismo, el uso de modelos PLS-DA permite procesar los espectros obtenidos y discriminar señales útiles para el pronóstico de nefritis lúpica. En una modalidad adicional, el uso de un segundo modelo PLS-DA permite pronosticar el estadio de la enfermedad a partir de las intensidades relativas de las señales espectrales asociadas a metabolitos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Describe un flujograma del proceso

25

Descripción detallada de la invención

- 30 La presente invención se refiere a un método para pronosticar nefritis lúpica mediante espectroscopía Raman aumentada con nanopartículas de oro, a partir del análisis de muestras de orina. El método permite detectar señales Raman asociadas a metabolitos urinarios y procesar dichas señales mediante modelos estadísticos de análisis discriminante.

5 En una modalidad preferida, el método comprende una etapa de preparación de nanopartículas de oro, una etapa de mezcla de una muestra de orina con la solución de nanopartículas de oro, una etapa de obtención de espectros Raman y una etapa de análisis estadístico de los espectros obtenidos mediante un modelo de cuadrados mínimos parciales acoplado a análisis discriminante.

10 En la etapa de preparación de nanopartículas de oro, las nanopartículas son sintetizadas mediante reducción química de AuCl_3 usando citrato de sodio al 2% p/v. Para ello, se añaden 1.250 μL de una solución 20 mM de AuCl_3 a 100 mL de agua MiliQ hirviendo, manteniendo agitación constante durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionan 500 μL de citrato de sodio y se mantiene agitación constante durante 30 minutos. Durante esta
15 etapa se observa un cambio de color de la suspensión, de azul oscuro a rojo, a medida que se forman partículas de oro coloidal monodispersas.

En una etapa posterior, se recolectan muestras de orina y se mezclan en una proporción 1:1 con la solución de nanopartículas de oro. Esta mezcla permite que los metabolitos presentes en la muestra urinaria interactúen con las nanopartículas, generando condiciones
20 adecuadas para la obtención de espectros Raman aumentados.

Luego de la mezcla de la muestra de orina con la solución de nanopartículas de oro, se toman los espectros Raman durante 1 segundo. Los espectros obtenidos contienen señales correspondientes a componentes presentes en la muestra de orina, incluyendo señales asociadas a metabolitos urinarios.

25 Posteriormente, los espectros Raman obtenidos son sometidos a análisis estadístico mediante un modelo de cuadrados mínimos parciales acoplado a análisis discriminante, PLS-DA. Dicho modelo permite pronosticar la nefritis lúpica mediante la identificación de señales Raman específicas asociadas a metabolitos urinarios. El análisis discriminante permite diferenciar muestras relacionadas con pacientes con nefritis lúpica a partir del perfil
30 espectral obtenido.

En una modalidad adicional de la invención, el método permite identificar el estadio de la nefritis lúpica con base en las intensidades relativas de los metabolitos detectados. Para ello, se emplea un segundo modelo PLS-DA, configurado para pronosticar cualquiera de los siete estadios a partir del análisis de las señales del espectro específicas de los
35 metabolitos.

5 En otra modalidad, los modelos PLS-DA pueden integrarse a un módulo de procesamiento de datos mediante inteligencia artificial. Este módulo permite automatizar el procesamiento de los espectros Raman, facilitando la generación del resultado pronóstico a partir de la información espectral obtenida.

La invención no se limita a la detección de un único biomarcador aislado, sino que permite
10 generar un perfil espectral más amplio de metabolitos presentes en la muestra de orina. Esta característica resulta adecuada para el análisis de nefritis lúpica, debido a que dicha condición se relaciona con alteraciones biológicas multifactoriales.

Aunque en una modalidad preferida la invención se aplica al pronóstico de nefritis lúpica, el método también admite su uso para la identificación de otros metabolitos distintos a los
15 asociados con nefritis lúpica, siempre que dichos metabolitos se encuentren presentes en la muestra analizada y generen señales detectables mediante espectroscopía Raman aumentada con nanopartículas de oro.

Mejor manera conocida para llevar a la práctica la invención

20 La mejor manera conocida para llevar a la práctica la invención comprende la síntesis de nanopartículas de oro mediante reducción química de AuCl_3 con citrato de sodio, la mezcla de las nanopartículas obtenidas con una muestra de orina en proporción 1:1, la adquisición de espectros Raman durante 1 segundo y el procesamiento de dichos espectros mediante modelos PLS-DA.

25 En una realización preferida, se preparan nanopartículas de oro añadiendo 1.250 μL de AuCl_3 20 mM a 100 mL de agua MiliQ hirviendo con agitación constante durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionan 500 μL de citrato de sodio al 2% p/v y se mantiene agitación constante durante 30 minutos. La formación de partículas de oro coloidal monodispersas se evidencia mediante el cambio de color de la suspensión de azul oscuro a rojo.

30 Una vez preparadas las nanopartículas, se recolecta una muestra de orina y se mezcla con la solución de nanopartículas de oro en proporción 1:1. La mezcla resultante se somete a espectroscopía Raman aumentada y se adquieren los espectros correspondientes durante 1 segundo. Los espectros obtenidos son analizados mediante un modelo PLS-DA para pronosticar nefritis lúpica a partir de señales Raman específicas asociadas a metabolitos
35 urinarios.

5 En una realización particular, las intensidades relativas de las señales Raman asociadas a metabolitos son analizadas mediante un segundo modelo PLS-DA para pronosticar el estadio de nefritis lúpica. Dicho modelo permite clasificar la muestra en uno de siete estadios, con base en el comportamiento espectral de los metabolitos detectados.

Opcionalmente, el procesamiento de los espectros mediante los modelos PLS-DA puede
10 ser integrado a un módulo de procesamiento de datos mediante inteligencia artificial, de manera que el análisis pueda automatizarse.

Aplicación industrial

La invención es susceptible de aplicación industrial, debido a que puede ser utilizada en el
15 campo de los métodos analíticos aplicados a muestras biológicas, particularmente en laboratorios de análisis de muestras biológicas, laboratorios de investigación biomédica y entornos de desarrollo de tecnologías analíticas para el pronóstico de nefritis lúpica.

El método permite analizar muestras de orina mediante espectroscopía Raman aumentada con nanopartículas de oro, generando información espectral que puede ser procesada
20 mediante modelos estadísticos para pronosticar nefritis lúpica. En consecuencia, la invención puede reproducirse mediante etapas técnicas definidas de preparación de nanopartículas, mezcla de muestra, adquisición espectral y procesamiento estadístico de datos.

Asimismo, la invención puede ser implementada mediante equipos de espectroscopía
25 Raman, reactivos para síntesis de nanopartículas de oro y un módulo de procesamiento de datos asociado al análisis estadístico de los espectros obtenidos. Por tanto, la invención puede implementarse y utilizarse en actividades analíticas o de investigación relacionadas con el análisis de muestras biológicas y el pronóstico de nefritis lúpica.